

Struktur- und Funktionsanalyse der hochkonservierten Stressprotease DegP von *E. coli*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Michael Meltzer

aus Eschwege
geboren am
14.12.1978

Gutachter:
Prof. Ehrmann, Prof. Siebers, Prof. Esche

Prüfungsdatum:
18.12.2008

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

Hauske, P., Ottmann, C., Meltzer, M., Ehrmann, M. und Kaiser M. (2008) Allosteric regulation of proteases.

Chem. Biochem., im Druck

Meltzer, M., Hasenbein, S., Hauske, P., Kucz, N., Merdanovic, M., Grau, S., Beil, A., Jones, D., Krojer, T., Clausen, T., Ehrmann, M. und Kaiser, M. (2008) Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control.

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **47**: 1332-1334

Angew. Chem. **120**: 1352-1355

Kucz, N., Meltzer, M. und Ehrmann, M. (2006) Periplasmic proteases and protease inhibitors.

The Periplasm, ASM Press, ed. M. Ehrmann: 150-170

In Vorbereitung

Meltzer, M., Hauske, P., Ottmann, C., Clausen, T., Ehrmann, M. und Kaiser, M., Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors.

Merdanovic, M., Meltzer, M., Kucz, N., Pöpsel, S., Beil, A., Soerensen, R., Hauske, P., Kaiser, M., Nagel-Steger, L., Sickmann, A., Huber, R., Clausen, T. und Ehrmann, M.

Determinants of structural and functional plasticity of a widely conserved protease chaperone machine.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	14
2. EINLEITUNG	16
2.1. Der Modellorganismus <i>Escherichia coli</i>	16
2.2. Der Aufbau von Gram negativen Bakterien	16
2.2.1. Das Cytoplasma	16
2.2.2. Die Innenmembran	17
2.2.3. Das Periplasma	18
2.2.4. Die Außenmembran	18
2.3. Proteasen	19
2.3.1. Serinproteasen	20
2.4. Die HtrA Familie	22
2.5. Die periplasmatische Serinprotease DegP	24
2.5.1. Die Struktur von DegP	24
2.5.2. Die Chaperonfunktion von DegP	28
2.5.3. Die Proteasefunktion von DegP	29
2.5.4. Die transkriptionelle Regulation von DegP	31
2.5.4.1. Die Cpx Transkriptionsregulation	31
2.5.4.2. Die RpoE Transkriptionsregulation	33
2.6. Zielsetzung der Arbeit	36
3. MATERIAL	37
3.1. Allgemeines	37
3.2. Bakterienstämme und Plasmide	37
3.2.1. <i>E. coli</i> Stämme	37
3.2.2. Vektoren und Plasmide	38
3.2.2.1. Vektoren	38
3.2.2.2. Plasmide	38
3.3. Nukleinsäuren	38
3.4. Proteine	39
3.4.1. Enzyme	39
3.4.2. Restriktionsendonukleasen	39
3.4.3. Sonstige Proteine	39
3.4.4. p-Nitroanilin Peptide	40
3.4.5. Inhibierende Peptide	40
3.4.6. Aktivierende Peptide	41
3.5. Antiseren	41
3.6. Feinchemikalien	42
3.7. Diverses	42
3.8. Geräte	42

4. METHODEN	44
4.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden	44
4.1.1. Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	44
4.1.2. Haltung und Sicherung von Zellen und Plasmiden	44
4.1.2.1. Herstellung von Flüssigmedien und Nährböden	44
4.1.2.2. Medienzusätze	45
4.1.2.2.1. Antibiotika	45
4.1.2.2.2. Zusätze	45
4.1.2.3. Ausstreichen von Bakterienstämmen	46
4.1.2.4. Anzucht von Flüssigkulturen	46
4.1.2.5. Lagerung von Stämmen	46
4.1.2.6. Lagerung von Plasmiden	46
4.1.3. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	47
4.1.4. Transformation	47
4.1.4.1. TSS-Transformation	47
4.1.4.2. Elektroporation	48
4.1.4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Elektroporation	48
4.1.4.2.2. Transformation durch Elektroporation	48
4.1.4.3. Chemische Transformation	49
4.1.4.3.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock	49
4.1.4.3.2. Transformation der kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock	50
4.1.5. Bakterienstammkonstruktion durch P1-Transduktion	50
4.1.5.1. Herstellung eines P1-Lysats	50
4.1.5.2. P1-Transduktion	50
4.1.5.3. Konstruktion von Bakterienstämmen	51
4.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden	51
4.2.1. Plasmid-DNA Präparation	51
4.2.2. Restriktionshydrolysen der Plasmid-DNA	51
4.2.3. Gelelektrophorese	52
4.2.3.1. Agarosegelelektrophorese	52
4.2.3.2. SDS-Gelelektrophorese	52
4.2.3.3. Tris-Tricin Gelelektrophorese	54
4.2.4. Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen	55
4.2.4.1. Coomassie-Blau Färbung	55
4.2.4.2. Silberfärbung	56
4.2.4.3. Western-Blot	57
4.2.4.3.1. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	57
4.2.4.3.2. Immunodetektion von Proteinen	57
4.2.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen mittels UV/VIS-Spektroskopie	59
4.2.5.1. UV/VIS-Spektroskopie: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	59
4.2.5.2. UV/VIS-Spektroskopie: Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	60
4.3. Proteinbiochemische Methoden	60
4.3.1. Dialyse von Proteinlösungen	60

4.3.2. TCA-Proteinfällung	61
4.3.3. Gesamtproteinisolierung aus <i>E. coli</i>	61
4.3.4. Proteinreinigung	61
4.3.4.1. Proteinreinigung von Proteinen mit His-Tag (DegP)	61
4.3.4.1.1. Anzucht des Überexpressionsstamms MA001/pCS20 und MA001/pAB31-36	61
4.3.4.1.2. Zellaufschluss des Überexpressionsstamms MA001/pCS20 und MA001/pAB31-36	62
4.3.4.1.3. DegP Reinigung über Ni-NTA Superflow (Qiagen)	62
4.3.4.2. OmpC Reinigung nach Arockiasamy und Krishnaswamy (2000)	63
4.3.4.2.1. Anzucht des Überexpressionsstammes DHB5a/pTrcOmpC	63
4.3.4.2.2. Zellaufschluss des Überexpressionsstammes DHB5a/pTrcOmpC	63
4.3.4.2.3. OmpC Reinigung aus dem Überexpressionsstamm DHB5a/pTrcOmpC	64
4.3.5. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von DegP und DegP-Derivaten	65
4.3.5.1. Gelfiltration	65
4.3.5.2. Cross-Link Methode	65
4.3.5.3. Analytische Ultrazentrifugation	66
4.3.6. Massenbestimmung mittels Elektrospray-Ionisationsmethode	67
4.3.7. Aktivitätstests von DegP	68
4.3.7.1. Spaltung von pNA-Peptiden durch DegP und DegP-Derivate	68
4.3.7.2. Caseinabbau durch DegP und DegP-Derivate	69
4.3.7.2.1. Abbau von β -Casein durch DegP und DegP-Derivate	69
4.3.7.2.2. Zymogramm	69
4.3.7.3. Abbau von MalS durch DegP und DegP-Derivate	70
4.3.8. Komplementation der Hitzesensitivität eines degP ⁻ -Stammes durch DegP und DegP-Derivate	71
4.3.9. Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC)	71

5. ERGEBNISSE 72

5.1. Entwicklung einer neuen Reinigung von DegP	72
5.1.1. Reinigung von DegP aus KU98/pCS20	72
5.1.2. Herstellung eines OmpC ⁻ Stammes durch P1-Transduktion	73
5.1.3. Modifizierung des Reinigungsprotokolls über Ni-NTA	74
5.2. Reinigung von DegP und DegP-Derivaten	74
5.2.1. Reinigung von DegP, DegP _{S210A} , DegP _{N45F,S210A} , DegP _{N45F,Q47F,S210A} und DegP _{N45F,Q47F,Q48F,S210A}	75
5.2.2. Reinigung von DegP _{N45F} , DegP _{N45F,Q48F} und DegP _{N45F,Q47F,Q48F}	75
5.3. Reinigung des Außenmembranproteins OmpC	76
5.4. Entwicklung und Etablierung eines quantifizierbaren Enzymassays	78
5.4.1. Entwicklung eines synthetischen DegP Substrats	78
5.4.2. Bestimmung der optimalen Bedingungen für den spezifischen Enzymassay	80
5.4.2.1. pH-Toleranz von DegP	80
5.4.2.2. Einfluss der Ionenstärke auf die Enzymaktivität	81
5.4.2.3. Einfluss von bivalenten Kationen	82
5.4.2.4. Einfluss von Reduktionsmitteln	82

5.4.2.5. Einfluss von Dimethylsulfoxid	82
5.5. Optimierung des pNA Substrates durch Austausch einzelner Aminosäuren	83
5.5.1. Bestimmung der kinetischen Konstanten für das Substrat SPMFKGV-pNA	83
5.5.2. Veränderung der spezifischen Aktivität und kinetischen Daten durch Aminosäureaustausch beim pNA Substrat	85
5.6. Inhibierung der proteolytischen Aktivität von DegP	86
5.6.1. Chloromethylketon- und Boronsäure-Derivate als Inhibitoren	86
5.6.2. Test weiterer Chloromethylketon Peptide	88
5.6.3. Beweis einer nicht-kompetitiven Inhibierung	89
5.7. Allosterische Aktivierung von DegP	91
5.7.1. Aktivierung der DegP Enzymaktivität durch kleine Stresspeptide	91
5.7.2. Isothermale Titrations Kalorimetrie von aktivierenden Peptiden	94
5.7.3. Die allosterische Aktivierung dominiert über die temperaturabhängige Aktivierung	96
5.7.4. Allosterische Aktivierung von DegP durch Zugabe von Volllängenproteinen und Proteolysefragmenten	97
5.7.4.1. Die Vorinkubation mit MaIS, β -Casein und OmpC erhöht die spezifische Aktivität von DegP	97
5.7.4.2. Allosterische Aktivierung von DegP durch Proteolysefragmente von β -Casein	98
5.8. Analysen des oligomeren Zustandes von DegP	99
5.8.1. Oligomerer Zustand von DegP bei 4°C und 43°C	99
5.8.2. Veränderung des oligomeren Zustandes von DegP durch Zugabe von aktivierenden Peptiden	101
5.8.2.1. Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels Gelfiltration	101
5.8.2.2. Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels Cross-Link Analyse	104
5.8.2.3. Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels analytischer Ultrazentrifugation	105
5.9. Die hocholigomeren Zustände von DegP zeigen hohe Proteaseaktivitäten	109
5.10. Mutationsanalyse des LA Loops von DegP	111
5.10.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität der LA Loop Mutanten im pNA Enzymtest	112
5.10.2. Abbau von Volllängenproteinen	113
5.10.2.1. Zymogramm von LA Loop Mutanten im Vergleich zum Wildtypen	113
5.10.2.2. β -Caseinabbau durch die LA Loop Mutanten im Vergleich zum Wildtypen	114
5.10.3. <i>In vivo</i> Komplementation der Hitzesensibilität eines degP ⁻ -Stammes durch DegP-Derivate im LA Loop	114
5.10.4. Aktivierung der LA Loop Mutanten im pNA-Enzymtest	116
5.10.5. Oligomerisierung der LA Loop Mutanten	116
5.10.5.1. Analyse der Oligomerisierung der LA Loop Mutanten mittels Cross-Link	117

5.10.5.2. Analyse der Oligomerisierung der LA Loop Mutanten mittels analytischer Ultrazentrifugation	117
5.11. RseA wird von DegP proteolytisch abgebaut	120
5.11.1. Verdau von RseA durch DegP	121
5.11.2. Bestimmung der DegP Schnittstelle innerhalb von RseA mittels Elektrospray-Ionisationsmethode	122
5.12. Substratspezifität von Serinproteasen	125
5.12.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität für die Serinproteasen	125
5.12.2. Analyse der Inhibitoren für die Serinproteasen	127
5.12.3. Bestimmung der IC ₅₀ Werte für das SPMFKGV-CMK bei Elastase und Subtilisin	129
6. DISKUSSION	131
6.1. DegP, eine Protease mit großer Toleranz gegenüber biochemischen Einflüssen	131
6.2. Allosterie, eine neue Regulation von DegP	132
6.2.1. DegP unterliegt einer allosterischen Aktivierung	132
6.2.2. Die allosterische Aktivierung ermöglicht eine effektive zelluläre Stressantwort	136
6.3. Strukturelle Veränderung durch die Allosterie und die dabei beteiligten Bereiche von DegP	137
6.3.1. Aufgabe der PDZ1 Domäne bei Proteolyse und allosterischer Aktivierung	137
6.3.2. Die allosterische Aktivierung führt zu einem hocholigomeren, aktiveren Zustand der Protease	139
6.3.3. Der LA Loop ist ein wichtiger Faktor für die Oligomerisierung	141
6.4. Eine mögliche Erweiterung der <i>in vivo</i> Funktionen von DegP	143
6.4.1. OmpC ein Substrat für Protease und Chaperon	143
6.4.2. Unterstützt DegP DegS als Protease des Antisigmafaktors RseA?	144
6.5. Die Substratspezifität von DegP im Vergleich zu humanen Serinproteasen	146
6.6. Ausblick: Die Charakterisierung von DegP und deren Bedeutung für andere Proteasen und mögliche medizinische Anwendungen	148
7. Literatur	151
Danksagung	164
Lebenslauf	165
Eidesstattliche Erklärung	166
Angaben zur Prüfung	167

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1. Schematische Abbildung der Zellwand eines Gram negativen Bakteriums	17
Abb. 2.2. Reaktionsmechanismus einer Serinprotease	21
Abb. 2.3. Sequenzalignment von <i>E. coli</i> und humanen HtrA Proteasen	23
Abb. 2.4.a Struktur des DegP Monomers (Krojer <i>et al.</i> , 2002)	25
Abb. 2.4.b Struktur des DegP Trimers (Clausen <i>et al.</i> , 2002)	26
Abb. 2.4.c Struktur des DegP Hexamers (Krojer <i>et al.</i> , 2002)	27
Abb. 2.5. Eigenschaft des Innenraums vom hexameren DegP (Groll <i>et al.</i> , 2005)	29
Abb. 2.6.a Cpx Transkriptionsregulation unter stressfreien Bedingungen	32
Abb. 2.6.b Cpx Transkriptionsregulation unter Stressbedingungen nach Raivio (Raivio, 2005)	33
Abb. 2.7.a σ^E Transkriptionsregulation unter stressfreien Bedingungen	35
Abb. 2.7.b σ^E Transkriptionsregulation unter Stressbedingungen (Gross <i>et al.</i> , 2007)	35
Abb. 5.1. SDS-PAGE der Überexpression und Reinigung des Proteins DegP	72
Abb. 5.2. SDS-PAGE und Western Blot gegen DegP- und OmpC-Antikörper des gereinigten DegPs	73
Abb. 5.3. Western Blot des gereinigten DegP gegen OmpC-Antikörper	74
Abb. 5.4.a SDS-Gel der neuen Überexpression und Reinigung des Proteins DegP _{S210A}	75
Abb. 5.4.b Vergleich von DegP und DegP-Derivaten nach der neuen Überexpression und Reinigung	76
Abb. 5.5. OmpC Reinigung aus MC4100/pTrcOmpC	77
Abb. 5.6. Profil der Komplettverdaus von Citratsynthase und Malatdehydrogenase durch DegP (www.weblogo.berkeley.edu)	78
Abb. 5.7. Bestimmung der spezifischen Aktivität für unterschiedliche pNA Peptid	79
Abb. 5.8. pH-Toleranz von DegP	80
Abb. 5.9. Einfluss der Ionenstärke auf die Enzymaktivität von DegP	81
Abb. 5.10. Bestimmung der kinetischen Daten für das Substrat SPMFKGV-pNA	84
Abb. 5.11. Konzentrationsreihe des SPMFKGV-CMK Inhibitors	87
Abb. 5.12.a Konzentrationsreihe des SPMFKGV-Boronsäure Inhibitors	88
Abb. 5.12.b Konzentrationsreihe des DPMFKLV-Boronsäure Inhibitors	89

Abb. 5.13. Test von weiteren putativen CMK Inhibitoren	90
Abb. 5.14. MaIS Verdau durch DegP mit und ohne Inhibitor	91
Abb. 5.15. Einfluss von putativ aktivierenden Peptiden auf die spezifische Enzymaktivität von DegP	93
Abb. 5.16. MaIS Abbau unter aktivierenden Bedingungen	94
Abb. 5.17. Bindung von DNRLGLVYLF an DegP_{S210A}	95
Abb. 5.18. MaIS Rückfaltung durch DegP mit und ohne Aktivator	97
Abb. 5.19. Allosterische Aktivierung durch MaIS, β-Casein und OmpC	98
Abb. 5.20. Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex200	100
Abb. 5.21. Überlagerung der Gelfiltrationsanalysen bei 4°C und 43°C	101
Abb. 5.22. Überlagerung der Gelfiltrationsanalysen unter (nicht-) aktivierenden Bedingungen	103
Abb. 5.23.a Cross-Link von DegP mit verschiedenen β-Casein Konzentrationen	105
Abb. 5.23.b Cross-Link von DegP ohne Aktivator, mit β-Casein und mit Proteolysefragmenten vom Komplettverdau des β-Caseins	106
Abb. 5.24.a Rohdaten der AUZ von DegP_{S210A}	107
Abb. 5.24.b Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{S210A} mittels Monte Carlo Analyse	108
Abb. 5.24.c Rohdaten der AUZ von DegP_{S210A} mit verdaulichem β-Casein	108
Abb. 5.24.d Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{S210A} mit verdaulichem β-Casein mittels Monte Carlo Analyse	109
Abb. 5.25. Präparative Gelfiltration von DegP mit verdaulichem β-Casein	110
Abb. 5.26. Zeitaufgelöster β-Casein Verdau durch DegP und DegP-Derivate	114
Abb. 5.27. Komplementation der Hitzesensibilität im Vergleich	115
Abb. 5.28. Cross-Link von LA Loop Mutanten mit und ohne Aktivator	118
Abb. 5.29.a Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} mittels Monte Carlo Analyse	119
Abb. 5.29.b Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} mit verdaulichem β-Casein mittels Monte Carlo Analyse	120
Abb. 5.30. Zeitaufgelöster RseA Verdau durch DegP	121
Abb. 5.31.a Übersicht des Massenspektrums des RseA Verdaulichs	123
Abb. 5.31.b Detailausschnitt des Massenspektrums im Bereich von 4700-5700 Da	124
Abb. 5.31.c Detailausschnitt des Massenspektrums im Bereich von 7800-8100 Da	124
Abb. 5.32.a Bestimmung des IC₅₀ von Elastase mit dem SPMFKGV-CMK	130

Abb. 5.32.b Bestimmung des IC ₅₀ von Subtilisin mit dem SPMFKGV-CMK	130
Abb. 6.1. Struktur des DegP 24mers (Krojer <i>et al.</i> , 2008)	140
Abb. 6.2. Detailausschnitt der Loop Triade im Hexamer und 24mer von DegP (Krojer <i>et al.</i> , 2008)	142
Abb. 6.3.a Erweiterte Darstellung der σ^E Transkriptionsregulation unter stressfreien Bedingungen	146
Abb. 6.3.b Erweiterung der Darstellung des σ^E Transkriptionsregulationsmechanismus unter Stressbedingungen nach Gross <i>et al.</i> (Gross <i>et al.</i> , 2007)	147

Tabellenverzeichnis

Tab. 5.1. Einfluss von Reduktionsmitteln auf die spezifische Aktivität von DegP	82
Tab. 5.2. Ermittelte kinetische Daten für das Substrat SPMFKGV-pNA	84
Tab. 5.3. Ermittelte kinetische Daten für das Substrat DPMFKLV-pNA	85
Tab. 5.4. K _{DS} und ΔH_{tot} der aktivierenden Peptide DNRLGLVYLF und DNRLGLVYFF	95
Tab. 5.5.a Oligomerisierung von DegP unter nicht-aktivierenden Bedingungen	105
Tab. 5.5.b Oligomerisierung von DegP unter aktivierenden Bedingungen	105
Tab. 5.6.a Verteilung der oligomeren Zustände von DegP _{S210A} ohne Aktivator	108
Tab. 5.6.b Verteilung der oligomeren Zustände von DegP _{S210A} mit verdautem β -Casein	109
Tab. 5.7. Oligomerer Zustand der vereinigten Fraktionen aus jeweils einem Peak	111
Tab. 5.8. Spezifische Aktivität der unterschiedlichen Oligomere von DegP	111
Tab. 5.9. Spezifische Aktivität der LA Loop Mutanten	112
Tab. 5.10. Ergebnisse der Zymogramm-Gele von Wildtyp und LA Loop Mutanten	113
Tab. 5.11. Komplementationstest der Hitzesensibilität	115
Tab. 5.12. Bestimmung der Aktivierung der LA Loop Mutanten im pNA-Enzymtest	116
Tab. 5.13.a Verteilung der oligomeren Zustände von DegP _{N45F,Q47F,Q48F,S210A} ohne Aktivator	119
Tab. 5.13.b Verteilung der oligomeren Zustände von DegP _{N45F,Q47F,Q48F,S210A} mit verdautem β -Casein	120

Tab. 5.14. Zu testende Serinproteasen und ihre Reaktionspuffer	125
Tab. 5.15. Spezifische Aktivitäten der Serinproteasen mit unterschiedlichen pNA Substraten	127
Tab. 5.16.a Substrate für die Inhibitorentests der Serinproteasen	128
Tab. 5.16.b Inhibitoranalysen der Serinproteasen mit CMK Peptiden	129

Abkürzungsverzeichnis

a	Alpha
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
A ₄₀₅	Absorption bei 405 nm
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
ara	Arabinose
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
β	Beta
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cam	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CMK	Chloromethylketon
ΔA ₄₀₅	Absorptionsänderung bei 405 nm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Bindekonstante für kooperative Bindung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrospray-Ionisationsmethode
FPLC	fast protein liquid chromatography

g	Gramm
h	Stunde
Htr	High temperature requirement protein
IC ₅₀	Konzentration der 50%igen Inhibierung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
k	Kilo (10 ³)
Konz.	Konzentration
λ	Lambda
l	Liter
m	Milli (10 ⁻³)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
n	Nano (10 ⁻⁹)
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NZA	NZ-Amine
OD	optische Dichte
OMP	Außenmembranprotein
%	Prozent
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglycol
pNA	p-Nitroanilin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

TCA	Trichloressigsäure
tet	Tetracyclin
Tsp	Tail-specific protease
TSS	transformation and storage solution
σ	Sigma
sec	Sekunde
Skp	Seventeen kilodalton protein
ss	Signalsequenz
SurA	Survival protein A
U	Unit
&	und
üN	über Nacht
üT	über Tag
UV	ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbares Licht
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Die Stressantwort von *Escherichia coli* wird durch ein komplexes System, bestehend aus einer Signaltransduktionskaskade, Transkriptionsfaktoren, Proteasen, Faltungskatalysatoren und Chaperonen gesteuert. Eine besonders wichtige Rolle spielt hierbei das hochkonservierte, periplasmatische Hitzeschockprotein DegP mit seiner Doppelfunktion als Chaperon und Protease.

Ziel dieser Arbeit war es, DegP biochemisch und strukturell in seiner Funktionsweise als Protease zu charakterisieren und eine Möglichkeit der medizinischen Anwendung durch eine Inhibierung von DegP zu klären. Als Grundlage für diese Funktionsanalysen wurden die ersten quantifizierbaren Enzymtests mit den neu entwickelten spezifischen Substraten SPMFKGV-pNA und DPMFKLV-pNA etabliert. Hierdurch konnte eine grundsätzliche biochemische Charakterisierung der Proteaseeigenschaft durchgeführt werden, die verdeutlichte, dass DegP eine hohe Toleranz gegenüber vielen Stressbedingungen, wie z.B. pH-Wert und Ionenstärke aufweist, wodurch es *in vivo* seine Funktion in der Stressantwort aufrecht erhalten kann. In weiteren Versuchen konnten erste Inhibitoren in Form von Chloromethylketon- und Boronsäurederivaten der Substrate für DegP entwickelt werden, die zusätzlich eine Röntgenkristallstrukturanalyse von DegP im aktiven Zustand mit gebundenem Substrat vorantreiben sollten.

Bei den Analysen der enzymatischen Funktion konnte die für DegP neue Form der allosterischen Aktivierung bestimmt werden. Diese Aktivierung wird durch fehlgefaltete Proteine und kleine Peptide, die *in vivo* Stresssignale darstellen, ausgelöst. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass die Proteasefunktion von DegP durch ein temperaturabhängiges System gesteuert wird und bei hohen Temperaturen aktiv ist, wohingegen bei niedrigen Temperaturen die Chaperonfunktion überwiegt (Spiess *et al.*, 1999). Nachteil dieser Regulation ist, dass nicht alle Stressbedingungen mit einer solchen Veränderung *in vivo* einhergehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Proteasefunktion auch bei niedrigen Temperaturen allosterisch aktiviert werden kann und DegP so universell auf Stressbedingungen reagieren kann. Dies unterstreicht die wichtige Funktion in der Stressantwort bei *E. coli*.

Durch Oligomerisierungsanalysen mittels Gelfiltration, Cross-Link Methode und analytischer Ultrazentrifugation konnte zusätzlich eine Veränderung des oligomeren Zustandes von DegP infolge der allosterischen Aktivierung bestimmt werden. Das

hexamere DegP kann durch Bindung der Aktivatoren, vermutlich an die PDZ1 Domäne, zu einem Dodecamer bzw. 24mer hocholigomerisieren. Durch Analysen der Enzymaktivität der einzelnen DegP Zustände konnte gezeigt werden, dass das Hexamer nur eine Art Ruhezustand und das Dodecamer und das 24mer die enzymatisch aktiven Zustände darstellen.

Durch Mutantenanalysen konnte die essentielle Rolle der sogenannten Loop Triade, insbesondere die des LA Loops, deutlich gemacht werden. Ziel dieser Analysen war es, die Interaktion der Loop Triade bildenden Loops LA, L1 und L2 zu unterbinden und somit den funktionellen und strukturellen Einfluss der Loop Triade zu klären. Durch den Austausch einzelner, für die Interaktion des LA Loops mit dem L2 Loop essentieller Aminosäuren, konnten DegP Derivate hergestellt werden, die zwar die prinzipiellen Funktionen von DegP zeigten, aber bereits ohne die Zugabe von Aktivatoren einen hocholigomeren Zustand aufwiesen. Dies veranschaulicht zum einen die stabilisierende Funktion der Loop Triade für das Hexamer und zum anderen die Funktion als regulatorische Einheit im Wechsel zwischen dem proteolytisch relativ inaktiven Hexamer und den aktiven Formen des Dodecamers und 24mers.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *degP* nicht nur durch den Transkriptionsregulationsmechanismus von RpoE kontrolliert wird, sondern darüber hinaus als Protease selbst einen entscheidenden Faktor bei der Feinregulation der Stressantwort darstellt. Neben der Funktion als Chaperon, die es DegP ermöglicht, an der Maturation des Außenmembranproteins OmpC beteiligt zu sein, weist DegP eine unter Stressbedingungen auftretende zusätzliche Funktion als Protease des fehlgefalteten OmpC auf. Diese Proteolyse ist dabei der Auslöser für die Stressantwort der Zelle über den RpoE Regulationsmechanismus. Des weiteren konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass DegP direkt an der Proteolyse des Antisigmafaktors RseA beteiligt ist und so den limitierenden Schritt in der Hitzeschockantwort der Zelle aufhebt.

Durch die in dieser Arbeit nachgewiesene wichtige Rolle in der Stressantwort rückt DegP in den Fokus für die Entwicklung neuer Antibiotika. Auf Grundlage des entwickelten Enzymtests sollten z.B. High Throughput Screens ermöglichen, spezifische Inhibitoren zu entwickeln, die in der medizinischen Anwendung genutzt werden könnten.

2. Einleitung

2.1. Der Modellorganismus *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und wurde erstmals von Theodor Escherich im Jahr 1885 isoliert und charakterisiert. Bis zum heutigen Tag ist dieses Bakterium aufgrund seines schnellen Wachstums und der einfachen Kultivierung ein wichtiger Modellorganismus für die Forschung. Das natürliche Habitat von *E. coli* ist der Darm von homoiothermen Organismen (Brock *et al.*, 2000). Pathogene *E. coli* Stämme verursachen unter anderem infektiöse Harnwegserkrankungen, Diarrhöe und Lebensmittelvergiftungen.

Das Genom von *E. coli* besteht aus einer zirkulären DNA mit 4600 kb, welches etwa für 4300 unterschiedliche Proteine kodiert. *E. coli* ist als ein fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium klassifiziert. Aufgrund der Färbung nach Gram (Gram, 1884), neben der Morphologie eine wichtige taxonomische Einteilung, können Bakterien in zwei große Gruppen unterteilt werden. Die Gram positiven Bakterien können dauerhaft durch diese Färbemethode angefärbt werden, wohingegen Gram negative Bakterien durch einen Waschschrift mit Alkohol wieder entfärbt werden können. Dieses unterschiedliche Färbverhalten lässt sich durch die unterschiedliche Zellwandstruktur erklären. Bei den Gram positiven Bakterien liegt eine durchgehende Zellwand vor, Gram negative Bakterien im Gegensatz dazu besitzen eine Innen- und eine Außenmembran mit einem Zwischenraum, dem sogenannten Periplasma. *E. coli* zählt zu den Gram negativen Bakterien (Abb. 2.1.).

2.2. Der Aufbau von Gram negativen Bakterien

2.2.1. Das Cytoplasma

Im Cytoplasma von Gram negativen Bakterien liegen das genetische Material, das Nukleosom und die Ribosomen vor. Des weiteren sind Proteine, Vitamine, Ionen, Zucker,

Kohlenhydrate, Fett-, Nuklein- und Aminosäuren Bestandteile des Cytoplasma. Somit ist dieses Zellkompartiment für das Zellwachstum, den Metabolismus und die Replikation essentiell. Alle Proteine werden an den Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert, da nur hier die benötigten reduzierenden Bedingungen vorliegen. Viele der cytoplasmatischen Proteine sind ATP-abhängig, wohingegen die periplasmatischen Proteine aufgrund der Abwesenheit von ATP in diesem Kompartiment ATP-unabhängig sind (Rosen, 1987).

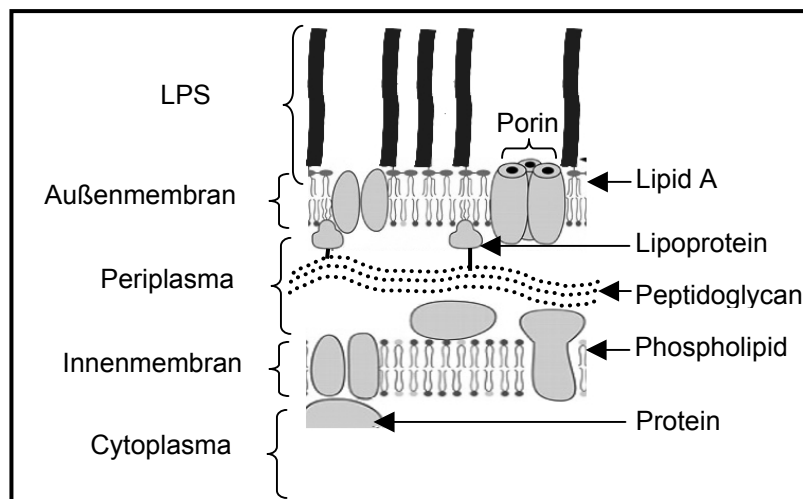


Abb. 2.1. Schematische Abbildung der Zellwand eines Gram negativen Bakteriums

2.2.2. Die Innenmembran

Die Innenmembran oder auch cytoplasmatische Membran von Gram negativen Bakterien begrenzt das Cytoplasma zum Periplasma und besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden, die etwa 8 nm dick ist. Durch ihre inkompressible, zweidimensionale Struktur (Koch, 1998) ist die Innenmembran für die zelluläre Integrität verantwortlich. Sie ist eine hochselektive Barriere für Moleküle, die ungeladene, lipophile Substanzen durchlässt (Nou und Kadner, 1998), jedoch für hydrophile Substanzen eher undurchlässig ist. Der Transport von hydrophilen Nährstoffen und der Export wird infolgedessen durch hochspezifische cytoplasmatische Membranproteine gesteuert (Boyd, 1998). Eine weitere wichtige Funktion der Innenmembran liegt in der Energieerzeugung. Essentielle Teile der elektrochemischen Gradientenpumpe und der Atmungskette sind in ihr verankert.

2.2.3. Das Periplasma

Der periplasmatische Raum ist als Bereich zwischen der cytoplasmatischen Membran (Innenmembran) und der periplasmatischen Membran (Außenmembran) definiert und macht mit einer Dicke von 13 bis 25 nm etwa 30% des Zellvolumens aus (van Wielink und Duine, 1990; Oliver, 1996). Die Peptidoglycanschicht und etwa 150 verschiedene Proteine sind im Periplasma zu finden. Aufgaben dieser Proteine sind unter anderem Substraterkennung und -aufnahme, Degradation von Nährstoffen und insbesondere die direkte oder indirekte Antwort auf Stresssignale. Das Periplasma ist aufgrund der eingelagerten Moleküle in der Lage, gewisse kurzfristige Änderungen in der Außenumgebung abzupuffern und so die Zelle zu schützen (Danese *et al.*, 1998).

2.2.4. Die Außenmembran

Die Außenmembran dient als Abgrenzung des Periplasmas und somit der Zelle nach außen. Sie ist asymmetrisch aus Phospholipiden und Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaut. Die LPS sind zur Außenseite der Zelle ausgerichtet (Abb.2.1.) und weisen in vielen Pathogenen teilweise Antigenfunktionen auf. Des weiteren dienen die LPS und Proteine als Bakteriophagenrezeptoren.

Ebenso wie die Innenmembran beinhaltet die Außenmembran eine Reihe von Proteinen, hauptsächlich Porine mit einer β -Fassstruktur, wie beispielsweise das Außenmembranprotein OmpC (Koebnik, 2000), aber auch hochaffine Rezeptoren und Lipoproteine. Die Porine ermöglichen kleinen hydrophilen Molekülen einen schnellen Durchgang durch die Außenmembran. Die hochaffinen Rezeptoren hingegen katalysieren einen substratspezifischen Transport durch die Membran (Nikaido, 1996). Die Aufgabe der Lipoproteine liegt in der Verknüpfung der Außenmembran mit der Peptidoglycanschicht im Periplasma. Hierdurch können Veränderungen des Umgebungsdrucks vermittelt und durch Anpassung innerhalb des Periplasmas eine Beschädigung der Zelle verhindert werden (Koch, 1998).

2.3. Proteasen

Proteasen und Peptidasen sind katalytisch aktive Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren. Ihre Einteilung in Klassen erfolgt nach ihren im Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren oder nach dem bei der Katalyse beteiligten Metallion. Insgesamt werden die Proteasen in der MEROPS Datenbank in sieben Klassen eingeteilt, dies sind die Serin-, Cystein-, Asparagin-, Threonin-, Glutamat-, Metalloproteasen und die sogenannten unbekannten Proteasen. Diese Klassen teilen sich wiederum in 51 Clans mit insgesamt 197 Familien auf. Durch die fortschreitende Sequenzierung vieler Genome erhöht sich die Anzahl der entdeckten Proteasen täglich. Bis zum heutigen Tag wurden bereits 95.150 Proteasen aus den verschiedensten Organismen sequenziert, jedoch erst 2.560 klassifiziert und von diesen nur 417 strukturell aufgelöst.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proteasen an unterschiedlichen Funktionen beteiligt sind, hierzu gehören neben dem Proteinabbau auch Schutzfunktionen und regulatorische Funktionen (Barrett *et al.*, 2004). Die Proteasen sind an der Proteindegradation in der Nährstoffaufnahme beteiligt, wohingegen die protektiven Proteasen am Abbau von missgefalteten oder beschädigten Proteinen beteiligt sind und so das Überleben der Zelle sichern. Die regulatorischen Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Proteinmaturation und der (De-)Aktivierung von Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Gottesman, 2003; Ehrmann und Clausen, 2004).

Die unterschiedlichen Aufgabenfelder für Proteasen machen deutlich, dass eine große Anzahl dieser Proteasen benötigt wird. So konnte für Bakterien gezeigt werden, dass Proteasen aus allen sieben Klassen und aus 42 von 51 Clans vorkommen. Für *E. coli* konnten immer noch 243 Mitglieder aus 31 unterschiedlichen Clans ermittelt werden, die sich auf alle zellularen Kompartimente verteilen. Im Periplasma von *E. coli* wurden 20 Proteasen nachgewiesen, wovon neun aus der Klasse der Serinproteasen, sechs aus der Klasse der Metalloproteasen, drei aus der Klasse der Cysteinproteasen und zwei aus der Klasse der sogenannten unbekannten Proteasen stammen.

2.3.1. Serinproteasen

Etwa 35% der unter der MEROPS Datenbank dokumentierten Proteasen gehören zu der Klasse der Serinproteasen. Die Serinproteasen, benannt nach dem nukleophilen Serinrest im aktiven Zentrum, wurden in Bakterien, Eukaryonten und Viren gefunden. Fast 50 Familien von Serinproteasen können aufgrund ihrer Aminosäuresequenz unterschieden werden, die meisten dieser Familien können in neun Clans eingruppiert werden (Rawlings und Barrett, 1994; Rawlings und Barrett, 2004).

An dem proteolytischen Mechanismus innerhalb der Serinproteasen ist im Allgemeinen neben dem Serinrest noch ein Protonendonator beteiligt. In den meisten Clans ist dies ein Histidin. Des weiteren ist ein dritter Rest, ein Aspartat, an der Orientierung des Imidazolringes des Histidins beteiligt (Hedstrom, 2002; Rawlings und Barrett, 2004). Der detaillierte Reaktionsmechanismus ist in Abb. 2.2. dargestellt.

Einer der bekanntesten Vertreter der Serinproteasen bei *Bacillus* ist das ursprünglich in *Bacillus subtilis* entdeckte Subtilisin. Durch die Sequenzierungsarbeit von Smith *et al.* (Smith *et al.*, 1966) und die Lösung der Kristallstruktur durch Wright *et al.* (Wright *et al.*, 1969) konnte gezeigt werden, dass Subtilisin nicht wie angenommen in die Chymotrypsin Familie S1, sondern in eine eigene Familie S8 eingeteilt werden konnte. Die *in vivo* Funktion von Subtilisin liegt im Proteinabbau für die Nahrungsaufnahme.

Zu den wichtigsten Serinproteasen bei Säugern zählen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase (Kaiser *et al.*, 1985), die wichtige Rollen im Verdauungssystem spielen, sowie Plasmin und Thrombin (Neurath *et al.*, 1967), die beide Schlüsselrollen in der Blutgerinnung einnehmen. Eine ebenfalls wichtige Aufgabe bei der Blutdruckregulation, der Elektrolyt- und Wasserhomöostase und bei entzündlichen Prozessen hat die Serinprotease Kallikrein (Neurath *et al.*, 1967). Alle sechs Serinproteasen gehören zu der Chymotrypsin Familie S1.

Ein weitere Gruppe von Serinproteasen aus der Familie S1 sind die HtrA (high temperature requirement) Proteine. Prokaryontische HtrA Proteasen sind für die Toleranz der Prokaryonten gegenüber verschiedenen Stressbedingungen verantwortlich, sowie für die Pathogenität. Humane Homologe sind am Zellwachstum, der Stressantwort auf fehlgefaltete Proteine, der Apoptose, sowie den Krankheiten Arthritis, Krebs und Alzheimer beteiligt (2.3. Die HtrA Familie).

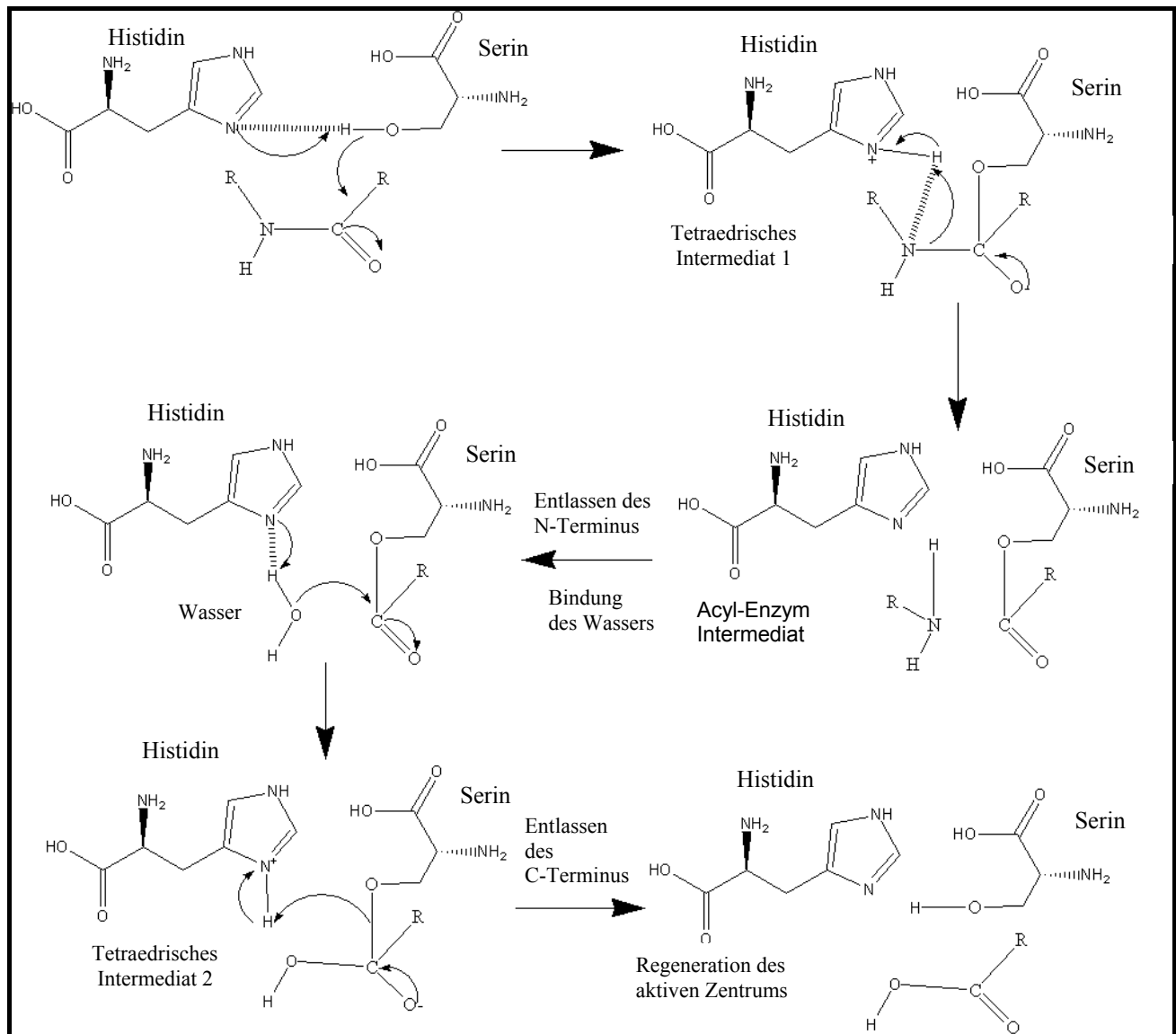


Abb. 2.2. Reaktionsmechanismus einer Serinprotease

Im ersten Schritt der Proteolyse greift die Hydroxygruppe des Serins die Carbonylgruppe des Substrats unter Bildung eines tetraedrischen Intermediats 1 nukleophil an. Das Histidin nimmt als Base das abgespaltene Proton des Serins auf. Durch die Ausbildung des tetraedrischen Intermediates 1 und der damit verbundenen Konformationsänderung kann das entstandene Oxyanion eine Position im aktiven Zentrum besetzen, die als Oxyanion-Loch bezeichnet wird. Diese Atome formen eine positiv geladene Tasche, welche die Carbonylgruppe des zu spaltenden Peptids aktiviert und die negative Ladung des Oxyanions durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das Imidazolium-Ion, welches durch die Protonenaufnahme von Serin entstanden ist, wird vom Aspartat über Wasserstoffbrücken stabilisiert. Das tetraedrische Intermediat 1 zerfällt unter Deprotonierung des Imidazolium-Ions in das Acyl-Enzym Intermediat. Die austretende Aminogruppe R'NH bildet das neue N-terminale Ende des geschnittenen Peptids und wird durch Wasser aus dem Lösungsmittel ersetzt. Im zweiten Schritt der Proteolyse greift das Wasser das Acyl-Enzym unter Bildung des tetraedrischen Intermediates 2 nukleophil an. Auch dieses Intermediat zerfällt, wobei zum einen das Serin und zum anderen die Carbonsäure entlassen wird, die das neue C-terminale Ende des geschnittenen Peptids bildet. Die Protease liegt jetzt wieder im aktiven Ausgangszustand vor und kann somit einen weiteren Proteolyse-Zyklus durchlaufen.

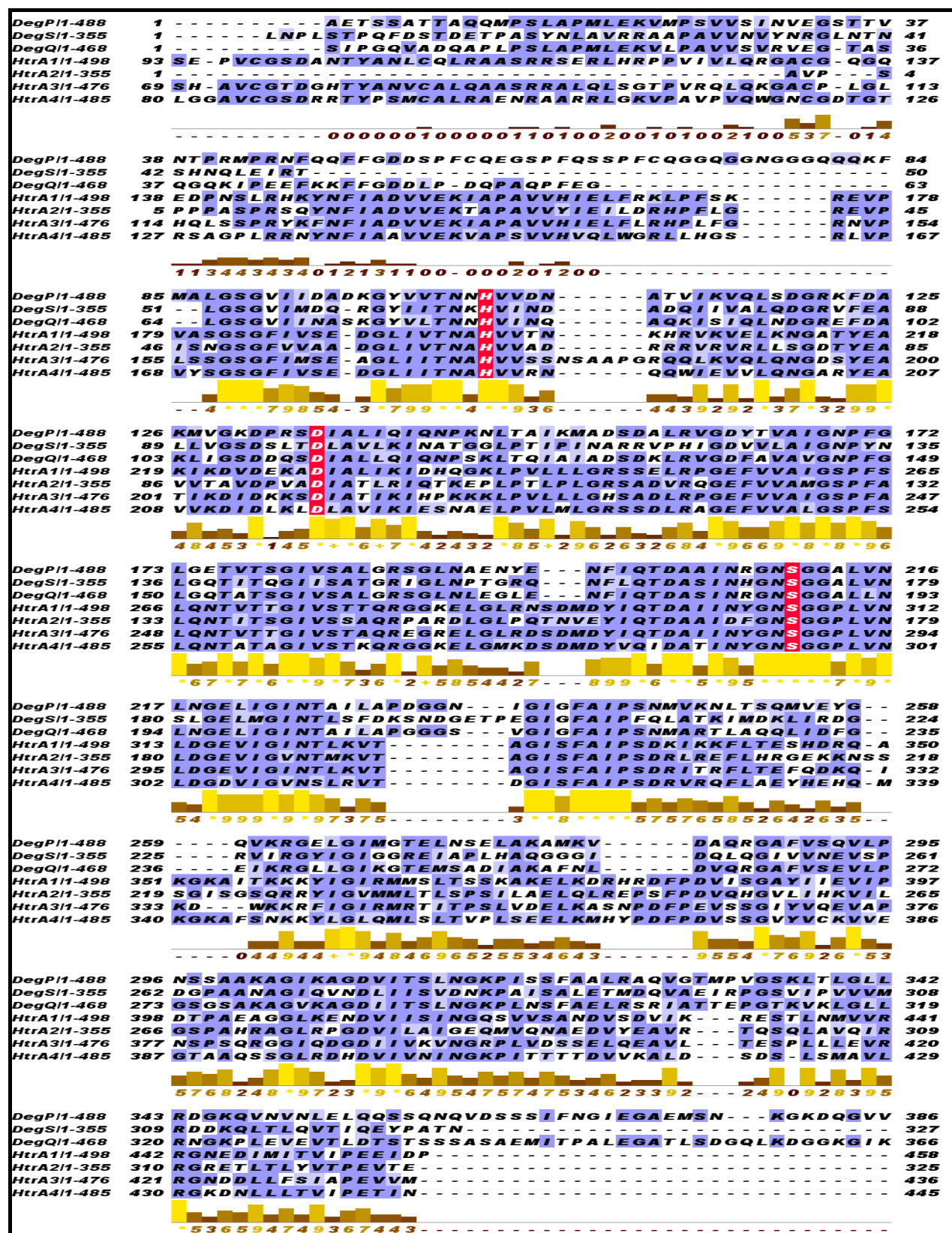
2.4. Die HtrA Familie

Die Aggregation von defekten Proteinen, wie sie bei Alzheimer oder der Prionenerkrankung auftreten, stellt ein großes Problem dar. Die Wahrscheinlichkeit der Aggregation ist *in vivo* in Zellen relativ hoch, da die Proteinkonzentration mit etwa 100 bis 150 mg/ml im interzellulären Raum relativ hoch ist. Deswegen haben Zellen ein umfangreiches System an Chaperonen und Proteasen entwickelt, die entweder un- bzw. fehlgefaltete Proteine rückfalten oder aber abbauen können (Wickner, *et al.* 1999). Hierbei zeichnet sich eine Proteinfamilie besonders aus, die HtrA Familie, die teilweise die Chaperon- und die Proteasefunktion in einem ATP unabhängigen Mechanismus in sich vereint.

DegP, das erste Mitglied der HtrA Proteasen, wurde in *E. coli* aufgrund seiner beiden Phänotypen der entsprechenden Nullmutante identifiziert und benannt. Die Mutante zeichnete sich durch ein Defizit des Wachstums bei erhöhten Temperaturen (Lipinska *et al.*, 1988) und durch ein Defizit in der Proteolyse von fehlgefalteten Proteinen aus (Strauch und Beckwith, 1988).

In der Zwischenzeit sind über 180 Mitglieder der HtrA Proteasen sowohl in RNA-Viren und Prokaryonten, als auch in Eukaryonten gefunden worden. Insbesondere die Verwandtschaft und die hohe Sequenzhomologie der HtrA Proteasen von *E. coli* und *H. sapiens* ist hier von Interesse (Abb. 2.3.).

Die ausgewählten HtrA Proteasen unterscheiden sich in ihrer Länge von 355 bis 458 Aminosäuren. Strukturell zeichnen sich die Mitglieder dadurch aus, dass sie eine Kombination aus einer proteolytischen Domäne und mindestens einer C-terminalen PDZ Domäne aufweisen (Pallen und Wren, 1997). Die hier vorgestellten HtrA Mitglieder unterscheiden sich in ihre Anzahl an PDZ Domänen. *E. coli* DegS und die *H. sapiens* Proteasen HtrA1, HtrA2, HtrA3 und HtrA4 weisen nur eine PDZ Domäne, *E. coli* DegP und DegQ zwei PDZ Domänen auf. Ursprünglich wurde vermutet, dass HtrA durch horizontalen Gentransfer von Prokaryonten zu Metazoen übertragen wurde (Koonin und Aravind, 2002), ebenso ist jedoch auch der gegenläufige Gentransfer möglich. Beide Thesen werden durch die große Homologie zwischen bakterieller und humaner Aminosäuresequenz unterstützt.

Abb. 2.3. Sequenzalignment von *E. coli* und humanen HtrA Proteasen

Teilbereiche der Sequenzen von *E. coli* DegP, DegQ und DegS sowie von humanen HtrA1, HtrA2, HtrA3 und HtrA4 wurden mittels „Jalview Java alignment editor“ analysiert (Clamp *et al.*, 2004). Konservierte Aminosäuren sind in dunkelblau und die homologen Aminosäuren in hellblau markiert. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot dargestellt.

Die humanen homologen HtrA Proteasen können in zwei Klassen eingeteilt werden. Das mitochondriale HtrA2 besitzt einen Transmembrananker und einen großen N-terminalen Bereich, der durch Prozessierung entfernt wird. An den N-Termini von HtrA1, HtrA3 und HtrA4 konnten sowohl erwartete Signalpeptide als auch Bereiche bestimmt werden, die als IGF-Bindedomänen und Proteaseinhibitordomäne dienen (Clausen *et al.*, 2002). Insbesondere HtrA1 ist heute von besonderem medizinischen Interesse. Grau *et al.* (Grau *et al.*, 2005) konnten nachweisen, dass HtrA1 an der Alzheimer Erkrankung beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von HtrA1 die Aggregation des Amyloid β erhöht auftrat.

Ebenso wie für die humanen HtrA Familienmitglieder können auch die *E. coli* HtrAs aufgrund ihrer Domänen eingeteilt werden. DegS weist im Vergleich zu DegP und DegQ einen N-terminalen Transmembrananker auf und besitzt nur eine PDZ Domäne. DegP und DegQ sind periplasmatische Serinproteasen mit zwei PDZ Domänen. Die Sequenzhomologie zwischen DegP und DegQ liegt bei knapp 60%, so dass es nicht verwunderlich ist, dass DegP und DegQ eine ähnliche Substratspezifität aufweisen und der Phänotyp der DegP Nullmutante durch Überexpression von *degQ* jedoch nur teilweise aufgehoben werden kann (Kolmar *et al.*, 1966, Waller und Sauer, 1996).

2.5. Die periplasmatische Serinprotease DegP

2.5.1. Die Struktur von DegP

DegP wird als ein 51 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert, welches nach der Maturierung 448 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 48 kDa aufweist. Die N-terminale Signalsequenz besteht hierbei aus 26 Aminosäuren (Lipinska *et al.*, 1988). Des weiteren hat DegP eine konservierte N-terminale chymotrypsinähnliche Proteasedomäne (Aminosäure 1-259), die die katalytische Triade, gebildet durch die Aminosäuren Histidin (H₁₀₅), Asparaginsäure (D₁₃₅) und Serin (S₂₁₀), beinhaltet. C-terminal sind zwei PDZ Domänen (PDZ1 Aminosäure 260-358; PDZ2 359-448) lokalisiert (Abb. 2.4.) (Rawlings und Barret, 1994; Fanning und Anderson, 1996; Songyang *et al.*, 1997; Krojer *et al.*, 2002). Diese Domänen sind 98 bzw. 89 Aminosäuren lang und wurden

ursprünglich nach drei eukaryotischen Proteinen („post-synaptic density protein“, „disc large“ und „zo-1-Protein“), in denen sie erstmals beschrieben wurden, benannt. Aufgabe der PDZ Domänen ist die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkung durch spezifische Bindungen, unter anderem zu den C-terminalen Aminosäuren der Zielproteine (Saras und Heldin, 1996).

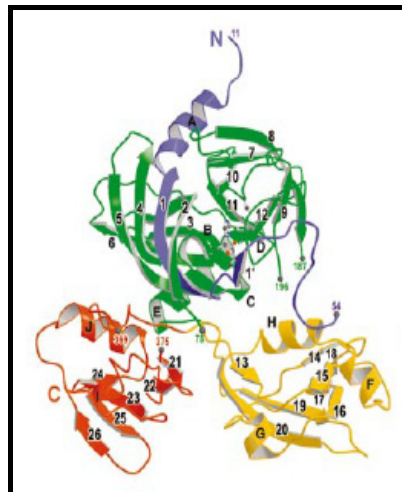


Abb. 2.4.a Struktur des DegP Monomers (Krojer *et al.*, 2002)

Kristallstruktur des DegP Monomers mit dem N-Terminus (blau), der Proteasedomäne (grün) und den beiden C-terminalen PDZ Domänen PDZ1 (gelb) und PDZ2 (rot).

DegP Monomere bilden einen homooligomeren Komplex. Als funktionelle Einheit wurde hierbei das Trimer bestimmt. Dieses Trimer hat eine trichterartige Form, wobei die Proteasedomäne zentral liegt und die PDZ1 und PDZ2 Domänen nach außen herausragen (Abb. 2.4.b). Die Proteasedomäne bildet bei dieser Struktur den starren Bereich, wohingegen die PDZ Domänen sehr flexibel sind. Diese Flexibilität der PDZ Domänen spiegelt ihre Funktion als eine Art Substratfänger aus der Umgebung um die Protease wieder (Clausen *et al.*, 2002).

Die größten bestimmten Komplexe sind Hexamer und Dodecamer. Das Dodecamer sollte sich dabei aus einem zweischichtigen Hexamer bilden (Kim *et al.*, 1999). 2002 konnte jedoch mittels Röntgenstrukturanalyse die Struktur von DegP gelöst werden. Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2002) belegten, dass DegP als Hexamer vorliegt (Abb. 2.4.c).

Das Hexamer wird aus zwei übereinander gestapelten Trimeren gebildet. Hierdurch entsteht ein molekularer Käfig mit den sechs Proteasedomänen als Boden und Dach. Die 12 PDZ Domänen bilden die sehr flexiblen Seitenwände des Käfigs. Die Kristallstruktur zeigt, dass die axialen Poren für den Zugang von Substraten vollständig blockiert sind, so

dass nur die Seitenwände in Form der PDZ Domänen als lateraler Zugang für die Substrate zur Verfügung stehen.

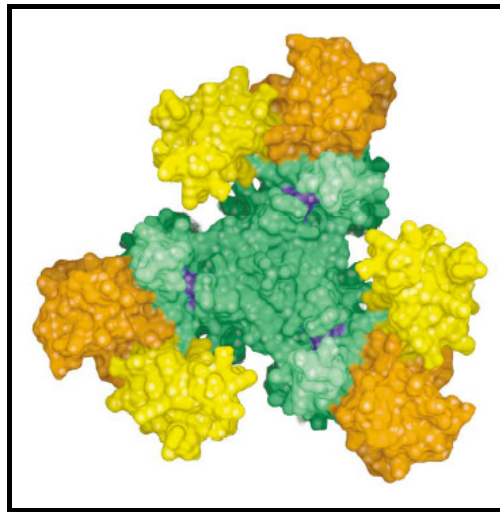


Abb. 2.4.b Struktur des DegP Trimers (Clausen *et al.*, 2002)

Molekulare Oberfläche des DegP Trimers mit funktionellen Untereinheiten. Die Lokalisation der unterschiedlichen DegP Domänen (Proteasedomäne in grün, Position des proteolytischen Zentrums in blau, PDZ1 Domäne in gelb und PDZ2 Domäne in orange) ist farblich markiert.

Wie Abb. 2.4.c zeigt, konnten zwei unterschiedliche Konformationen des DegP Hexamers kristallisiert werden. Es handelt sich um eine sogenannte offene und eine geschlossene Konformation. Bei der geschlossenen Konformation ist der Zugang zum Inneren des hexameren Käfigs durch die anliegenden PDZ Domänen vollständig verschlossen. In der offenen Konformation ist der Zugang in das Innere für Substrate möglich, wobei eine zuvor erfolgte Bindung der Substrate an die PDZ Domänen erwartet wird. Die PDZ Domänen blockieren den Zugang, so dass die putativen Substrate zuerst binden und dann in das Innere des Hexamers einfädeln. Ein ähnlicher zweistufiger Bindungsprozess wurde bereits für vergleichbare käfigformende Proteasen wie die Clp Protease postuliert (Wang *et al.*, 1997; Krojer *et al.*, 2002; Clausen *et al.*, 2002; Flynn *et al.*, 2004).

Die Stabilität der hexameren Struktur wird durch einen sehr langen N-terminalen Bereich, den LA Loop, aus 48 Aminosäuren erreicht. Ein großer Teil dieses Loops besteht aus einer typischen Q-Linker Region (Aminosäure 55-79), die sich durch flexible Glutamin- und Glycinreiche Bereiche auszeichnet (Wooton und Drummond, 1989). Diese Flexibilität ist der Grund, warum diese Region, ebenso wie die PDZ1 Domäne in der offenen Konformation, strukturell nicht aufgeklärt werden konnte. Der LA Loop eines Monomers ragt in das aktive Zentrum eines Monomers vom gegenüberliegenden Trimer und

umgekehrt. Dort interagiert dieser mit den Loops L1 und L2 des gegenüberliegenden Monomers und bildet die sogenannte Loop Triade. Auf Seiten des LA Loops sind drei Aminosäuren besonders essentiell für die Bindung. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuren Asparagin an der Position 45 und die beiden Glutamine an den Positionen 47 und 48.

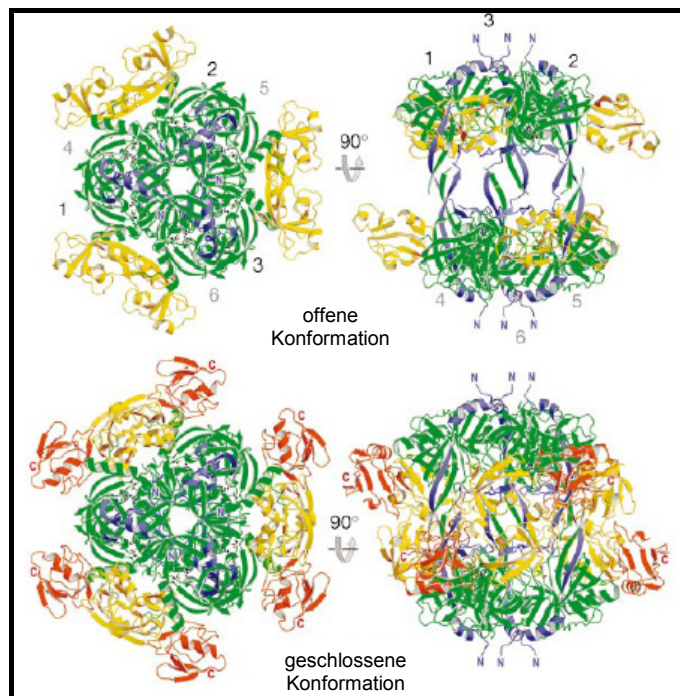


Abb. 2.4.c Struktur des DegP Hexamers (Krojer *et al.*, 2002)

Dargestellt ist die Auf- und Seitenansicht der offenen und geschlossenen Konformation des DegP Hexamers. Die Nomenklatur und die N-Termini der einzelnen Monomere sind eingezeichnet, sowie die unterschiedlichen Domänen farblich markiert (N-Termini in blau, Proteasedomänen in grün, PDZ1 Domänen in gelb und PDZ2 Domänen in rot). Aufgrund der großen Flexibilität der PDZ1 Domäne konnte deren Position bei der offenen Konformation des DegP Hexamers nicht aufgelöst werden.

Die von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2002) gelöste Kristallstruktur wurde unter Bedingungen hergestellt, bei denen DegP als Chaperon vorliegen sollte. Es wird vermutet, dass der Wechsel von DegP von Chaperon zu Protease mit einer Veränderung der Struktur einhergeht (Krojer *et al.*, 2002). In der gelösten Kristallstruktur blockiert der LA Loop nicht nur den Zugang zum aktiven Zentrum der Protease, sondern verhindert auch die korrekte Ausrichtung der S1 Bindetasche, die essentiell für die Proteolyse von Substraten ist. Die konformationelle Umorientierung der Loop Triade und die damit einhergehenden strukturellen Veränderungen sind vermutlich entscheidend für den Funktionswechsel von Chaperon zu Protease.

2.5.2. Die Chaperonfunktion von DegP

DegP zeichnet sich durch seine Doppelfunktion als Protease und Chaperon aus. Arbeiten von Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) haben gezeigt, dass bei niedrigen Temperaturen die Chaperonaktivität überwiegt. Es konnte eine erhöhte Rückfaltung der chemisch denaturierten Proteine MalS und Citratsynthase bestimmt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Temperatursensibilität von *degP*⁻ Mutanten durch die Coexpression von proteolytisch inaktivem DegP_{S210A} komplementiert wird (Spiess *et al.*, 1999).

Die postulierte Chaperonfunktion von DegP konnte *in vivo* durch Gendelektionen bestätigt werden. Doppeldeletionsmutanten von *degP* und *skp* bzw. *degP* und *surA* führten zu lethalen bzw. stark im Wachstum eingeschränkten Phänotypen (Rizzitello *et al.*, 2001). Für Skp und SurA konnte ebenfalls eine Chaperonfunktion gezeigt werden. Skp bindet an ungefaltete Außenmembranproteine und unterstützt deren Faltung. Eine Deletion von *skp* führt zu einer Abnahme der in der Außenmembran gebundenen Proteine (Chen und Henning, 1996). Gleiches konnte für *surA* gezeigt werden (Lazar und Kolter, 1996; Rouvière und Gross, 1996). Der synthetisch lethale Genotyp *surA*⁻ *degP*⁻ kann durch die Coexpression des proteolytisch inaktiven DegP_{S210A} komplementiert werden, was die physiologische Relevanz der Chaperonaktivität von DegP unterstützt. Die Untersuchungen der Doppeldeletionsmutanten von Rizzitello *et al.* (Rizzitello *et al.*, 2001) lassen vermuten, dass Skp, SurA und DegP redundante Funktionen aufweisen.

Das von Rizzitello *et al.* (Rizzitello *et al.*, 2001) aufgestellte Modell basiert auf zwei parallelen Wegen der Außenmembranproteinassemblierung. Zum einen könnte die Assemblierung im Periplasma durch eine Kombination der Chaperone DegP und Skp durchgeführt werden und im parallelen Weg von SurA. Wird nur einer der Wege durch Deletion ausgeschaltet, führt dies nur zu einer starken Reduktion des Wachstums, werden beide Wege durch Deletion eines Mitglieds dieses Weges ausgeschaltet, so führt dies zu einem lethalen Phänotyp.

Zusätzlich unterstützt die von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2002) gelöste Kristallstruktur die Möglichkeit, dass DegP als Chaperon fungiert, da sie Rückschlüsse auf mögliche Bindestellen für fehlgefaltete Proteine im Innenraum des DegP Hexamers zulässt. (Abb. 2.5.).

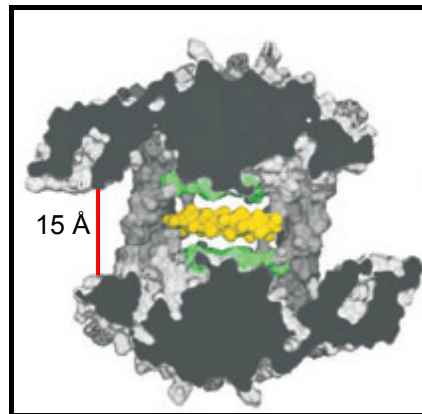


Abb. 2.5. Eigenschaft des Innenraums vom hexameren DegP (Groll *et al.*, 2005)

Die Abbildung zeigt ein halbiertes DegP Hexamer mit in dunkel grau eingefärbter Schnittstelle. Der Zugang zum Innenraum ist nur 15 Å groß. Hierdurch können nur ungefaltete Substrate den Innenraum erreichen, was die einmodulierte Polyalaninhelix (gelb) verdeutlichen soll.

Der Innenraum des DegP Hexamers hat eine Höhe von 15 bis 18 Å, wodurch deutlich wird, dass nur zumindest partiell ungefaltete Proteine hinein transportiert werden können. Zusätzlich konnten für Chaperone typische Reihen an hydrophoben Aminosäuren in dem Innenraum bestimmt werden. Zwei dieser hydrophoben Reihen werden von den Aminosäuren des LA und L2 Loops gebildet. Besonders interessant sind die hydrophoben Cluster der PDZ1 Domäne mit ihrer Anreicherung an potentiellen Bindestellen für Substrate. Die wechselnde Anordnung von polaren und hydrophoben Bereichen sowohl innerhalb eines Trimers als auch zwischen den beiden Trimeren eines Hexamers sollte eine Bindung der exponierten hydrophoben Seitenketten von Substraten ermöglichen (Krojer *et al.*, 2002; Groll *et al.*, 2005)

2.5.3. Die Proteasefunktion von DegP

Die katalytische Triade des *E. coli* DegPs wird wie bei allen Mitgliedern dieser Familie der Serinproteasen von den Aminosäuren Histidin (H₁₅₀), Asparaginsäure (D₁₃₅) und Serin (S₂₁₀) gebildet. Die Deletion einer dieser Aminosäuren führt zum Verlust der proteolytischen Aktivität (Skórko-Glonek *et al.*, 1995). Die Arbeiten von Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) zeigten, dass die Proteaseaktivität von DegP temperaturabhängig ist. Unter einer Temperatur von 20°C ist DegP fast vollständig proteolytisch inaktiv,

wohingegen bei Temperaturen über 30°C ein nicht linearer Anstieg der Aktivität bestimmt werden konnte, was für die Aufgabe als Hitzeschockprotein *in vivo* essentiell ist.

Ebenfalls wichtig für viele Proteasen bei Hitzeschock ist das breite Spektrum an Substraten. Als DegP Substrate sind die fehlgefalteten periplasmatischen Proteine MBP (Betton *et al.*, 1998), PhoA (Sone *et al.*, 1997) und MalS (Spiess *et al.*, 1999), die fehllokalisierten cytoplasmatischen Proteine TreF (Uhland *et al.*, 2000), OmpF (Misra *et al.*, 2000), die größtenteils ungefalteten bzw. denaturierten Proteine wie β -Casein, Malatdehydrogenase und Citratsynthase (Kim *et al.*, 1999), sowie Hybridproteine (Strauch und Beckwith 1988; Guigueno *et al.*, 1997) und rekombinante Proteine (Baneyx und Georgiou, 1991; Arslan *et al.*, 1998) bekannt. Alle diese Substrate haben gemeinsam, dass sie partiell ungefaltet sind. Vollständig gefaltete Proteine, wie BSA (Kim *et al.*, 1999) und Insulin (Swamy *et al.*, 1983), können von DegP nicht verdaut werden.

Weitere Untersuchungen von Modells substraten haben gezeigt, dass eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Schnitte nach Valin und Isoleucin auftritt und DegP somit eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren an der Position P₁ aufweist (Kolmar *et al.*, 1996). Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Arbeiten von Jones *et al.* (Jones *et al.*, 2002), die zeigen, dass die Pilin Untereinheit PapA vorzugsweise nach hydrophoben Aminosäuren geschnitten wird, doch insgesamt werden viele putative Schnittstellen nicht geschnitten. Dies kann möglicherweise mit der Unzugänglichkeit dieser Aminosäuren auf struktureller Ebene begründet werden (Kim *et al.*, 1999).

Insgesamt ist der Substraterkennungsmechanismus von DegP noch nicht vollständig geklärt. Die proteolytische Aktivität kann unspezifisch durch Diisopropylfluorophosphat (DFP), einen allgemeinen Serinproteaseinhibitor, inhibiert werden, wohingegen ein weiterer Inhibitor der Serinproteasen, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und verschiedene Chloromethylketone keine Wirkung zeigten (Lipinska *et al.*, 1990).

Ein aufgrund der quartären Struktur limitierter Zugang für Substrate in das Hexamer von DegP ist eine wichtige Voraussetzung für den regulatorischen Mechanismus einer spezifischen Proteolyse von ausschließlich ungefalteten Proteinen, wie es z.B. für ClpAP und HslUV gezeigt werden konnte (Wang *et al.*, 1997; Bochtler *et al.*, 1997; Bochtler *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000).

Der genaue Ablauf der Proteolyse innerhalb von DegP, sowie die Bestimmung der an der Bindung des Substrates beteiligten Aminosäuren, konnten aufgrund der fehlenden Röntgenkristallstruktur von DegP im proteolytisch aktiven Zustand bisher nicht genau geklärt werden. Groll *et al.* (Groll *et al.*, 2005) stellen die These auf, dass eine

Neuorientierung der Loop Triade, gebildet aus dem LA Loop eines Monomers mit dem L1 und L2 Loop eines weiteren Monomers, zu der Ausbildung der aktiven Serinprotease DegP führt (2.4.1. *Die Struktur von DegP*).

2.5.4. Die transkriptionelle Regulation von DegP

Untersuchungen aus den letzten zehn Jahren haben gezeigt, dass die Expression von *degP* durch mindestens zwei Signalwege reguliert wird, die zum Teil ineinander greifen (Alba und Gross, 2004; Raivio, 2005). Bei den beiden Signalwegen handelt es sich zum einen um das Cpx Zweikomponentensystem und zum anderen um den σ^E Transkriptionsregulationsmechanismus. Obwohl einige Induktionssignale und beeinflusste Zielgene bei beiden Signalwegen übereinstimmen, haben sie ihre eigenen einzigartigen Signalstoffe und zeigen unterschiedliche physiologische Rollen in der Zelle.

2.5.4.1. Die Cpx Transkriptionsregulation

Die Cpx Transkriptionsregulation ist eine Antwort auf Stresssignale, die im Periplasma von *E. coli* auftreten. Hierbei handelt es sich um ein typisches Zweikomponentensystem, an dem die membrangebundene Histidinkinase CpxA und der Transkriptionsregulator CpxR beteiligt sind.

Das Cpx System ist sowohl positiven als auch negativen Autofeedback Mechanismen unterworfen (Raivio *et al.*, 1999). Unter nicht induzierenden Bedingungen interagiert CpxP mit der periplasmatischen Domäne von CpxA. Hierdurch ist CpxA als Phosphatase aktiv, die den putativen Transkriptionsfaktor CpxR dephosphoryliert. CpxA kann durch verschiedene Stresssignale im Periplasma, die zu fehlgefalteten Proteinen führen, induziert werden (Abb. 2.6.a und Abb. 2.6.b). Zu diesen Stresssignalen gehören Erhöhung des pH-Wertes, Überexpression von dem Lipoprotein NlpE, Fehlfaltung von Pilus Untereinheiten und Veränderungen in der Zusammensetzung der Membranen (Nakayama und Watanabe, 1995; Snyder *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Mileykovskaya und Dowhan, 1997; Danese und Silhavy, 1998; Danese *et al.*, 1998).

Die durch die Stressbedingungen auftretenden fehlgefalteten Proteine binden an CpxP, wodurch dieses aktiviert wird. Der Mechanismus der CpxA Aktivierung ist bis heute noch nicht geklärt, hängt aber mit der Auflösung der CpxP/CpxA Komplexes zusammen. Das frei werdende CpxA wird als Proteinkinase aktiv, welche im Cytoplasma das Protein CpxR phosphoryliert. Hierdurch kann das CpxR als Transkriptionsfaktor fungieren, der spezifisch an Promotoren für Gene der Stressantwort bindet und die Transkription dieser fördert. Zu den regulierten Genen gehört unter anderem DegP, welches so in großen Mengen überexprimiert werden kann (Cosma *et al.*, 1995; Danese *et al.*, 1995; Pogliano *et al.*, 1997; Missiakas und Raina, 1998; Ruiz *et al.*, 2002).

Nach der Proteolyse der fehlgefalteten Proteine, unter anderem durch DegP, bindet CpxP erneut an CpxA, so dass die Phosphataseaktivität angeschaltet wird und CpxR dephosphoryliert wird.

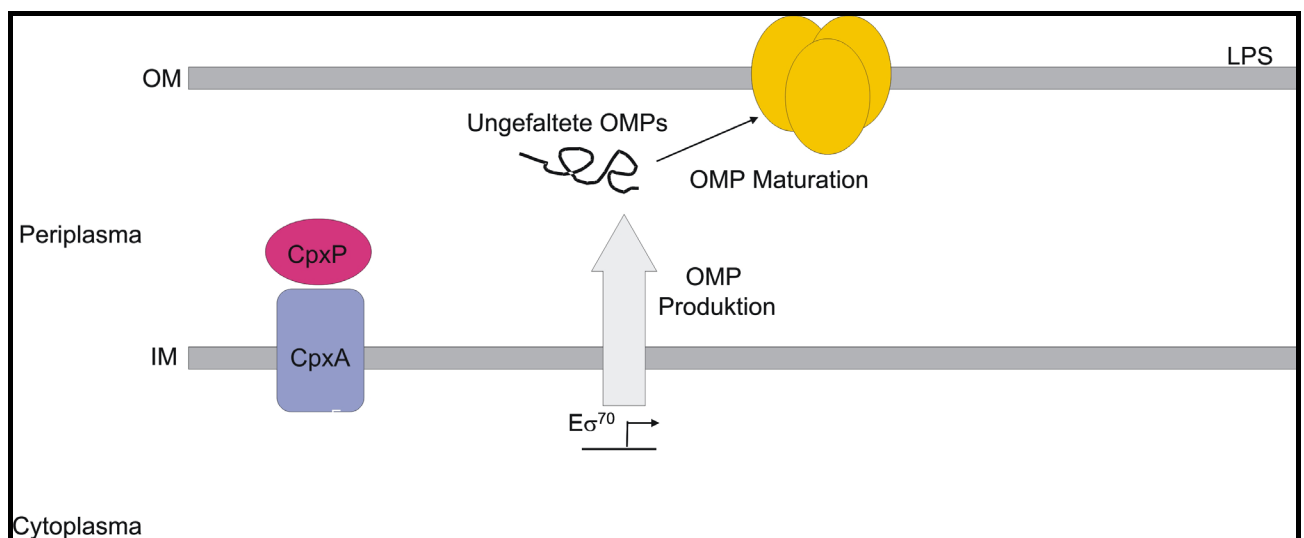


Abb. 2.6.a Cpx Transkriptionsregulation unter stressfreien Bedingungen

Die allgemeine Genexpression unter optimalen Wachstumsbedingungen erfolgt unter dem „housekeeping“ Sigmafaktor σ^{70} . Die Außenmembranproteine werden in das Periplasma transportiert, wo ihre Maturation stattfindet. CpxP ist an der periplasmatischen Domäne von CpxA gebunden, so dass diese als Phosphatase vorliegt. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid; OMP, Außenmembranprotein

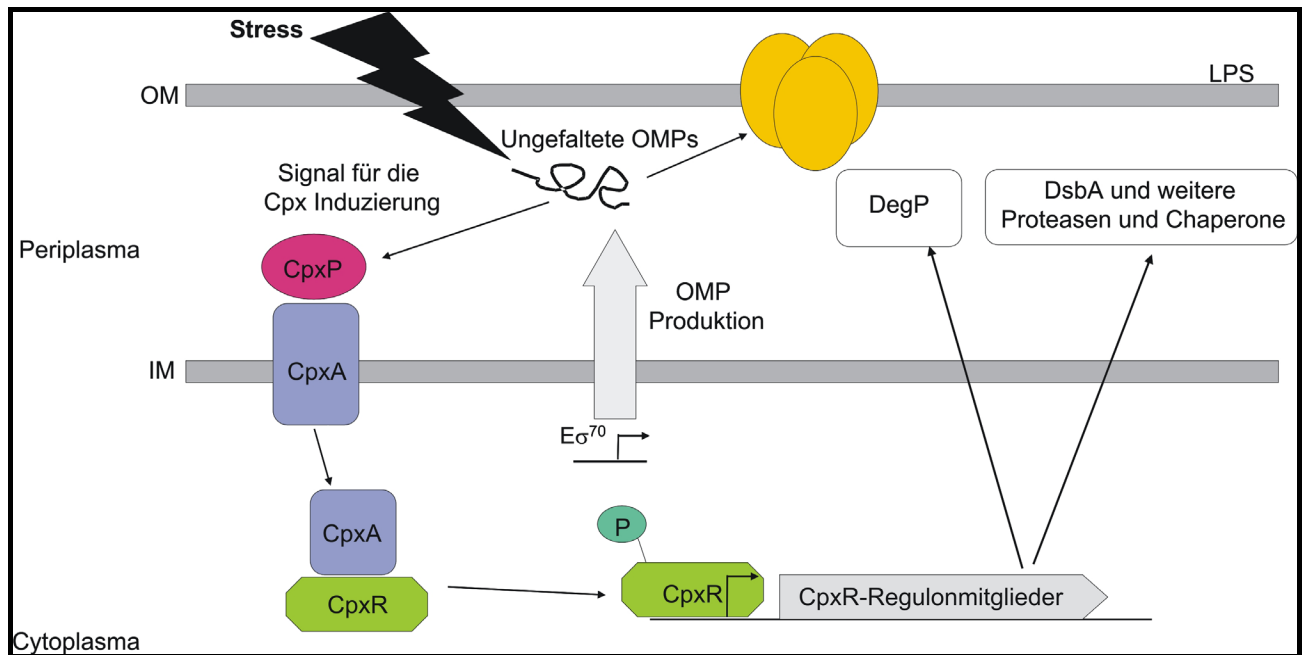


Abb. 2.6.b Cpx Transkriptionsregulation unter Stressbedingungen nach Raivio (Raivio, 2005)

Die erhöhte Menge von ungefalteten bzw. fehlgefalteten Proteinen führt zur Induktion des Cpx Transkriptionsmechanismus. Diese Proteine verursachen durch Bindung an CpxP die Aktivierung der Proteasefunktion. CpxA wird von CpxP getrennt. Hierdurch wird CpxA als Proteinkinase in das Cytoplasma entlassen und phosphoryliert CpxR. Das phosphorylierte CpxR kann so als Transkriptionsfaktor die Stresssignalantwort einleiten. Zu den hochregulierten Genen gehört hierbei *degP*. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid; OMP, Außenmembranprotein

2.5.4.2. Die RpoE Transkriptionsregulation

Die RpoE Transkriptionsregulation ist wie das Cpx Zweikomponentensystem ein Regulationsmechanismus, welcher Stresssignale, die im Periplasma auftreten, über die Innenmembran zum cytoplasmatischen Transkriptionssystem übermittelt (Alba *et al.*, 2002) (Abb. 2.7.a und Abb. 2.7.b).

Unter für die Zelle stressfreien Bedingungen ist RpoE (σ^E) an die Innenmembran sequestriert. Diese Inaktivierung wird über die Transmembrandomäne des Anti-Sigma Faktors RseA vermittelt, indem RseA an RpoE bindet.

Als Induktionssignal für Stress dienen fehlgefaltete Außenmembranproteine (Omps) wie OmpC im Periplasma. Diese Omps präsentieren nur im fehlgefalteten Zustand ihre C-Termini, welche wiederum als Aktivatoren für DegS, ein HtrA Familienmitglied in *E. coli*, dienen. DegS ist eine im Periplasma lokalisierte, membrangebundene Protease, die nach

der Bindung der C-Termini von Omps im aktiven Zustand vorliegt und den initialen Schnitt von RseA zwischen dem Valin 148 und dem Serin 148 (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001; Alba *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003) einführt. Dieser erste Schnitt ist der limitierende Schritt in der proteolytischen Kaskade im Regulationssystem von RpoE (Chaba *et al.*, 2007) und führt zu der Abspaltung der periplasmatischen Domäne von RseA. Hierdurch und im Zusammenspiel mit der postulierten Bindung des Regulatorproteins RseB an die auftretenden fehlgefalteten Proteine (Collinet *et al.*, 2000) wird die durch RseB vermittelte Inhibierung des zweiten Schnitts mittels der Protease RseP aufgehoben (De Las Penas *et al.*, 1997; Cezairliyan und Sauer, 2007; Kim *et al.*, 2007). RseP führt einen proteolytischen Schnitt innerhalb des Transmembransegments von RseA durch, wodurch die N-terminale Domäne von RseA mit dem gebundenen RpoE in das Cytoplasma entlassen wird (Ades *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2004). Weitere proteolytische Schritte durch ClpXP und Lon im Cytoplasma führen zur Freisetzung von RpoE, so dass dieses als alternativer Sigmafaktor aktiv werden kann und die Stressantwortpromotoren reguliert (Flynn *et al.*, 2004; Levchenko *et al.*, 2005; Chaba *et al.*, 2007).

Zu den hierdurch hochregulierten Genen gehören *degP*, *rseA* und *rpoE* selbst. Unter anderem führt DegP im weiteren zum Abbau der den RpoE Transkriptionsregulationsmechanismus aktivierenden fehlgefalteten Omps. Die Omps hingegen werden durch die RpoE Transkriptionskontrolle in ihrer Expression herunterreguliert.

Durch die Überexpression von *rseA* und *rpoE*, dem Abbau der fehlgefalteten Proteine durch DegP und der Reduzierung neuer Omps kann somit wieder der Ausgangszustand erreicht werden.

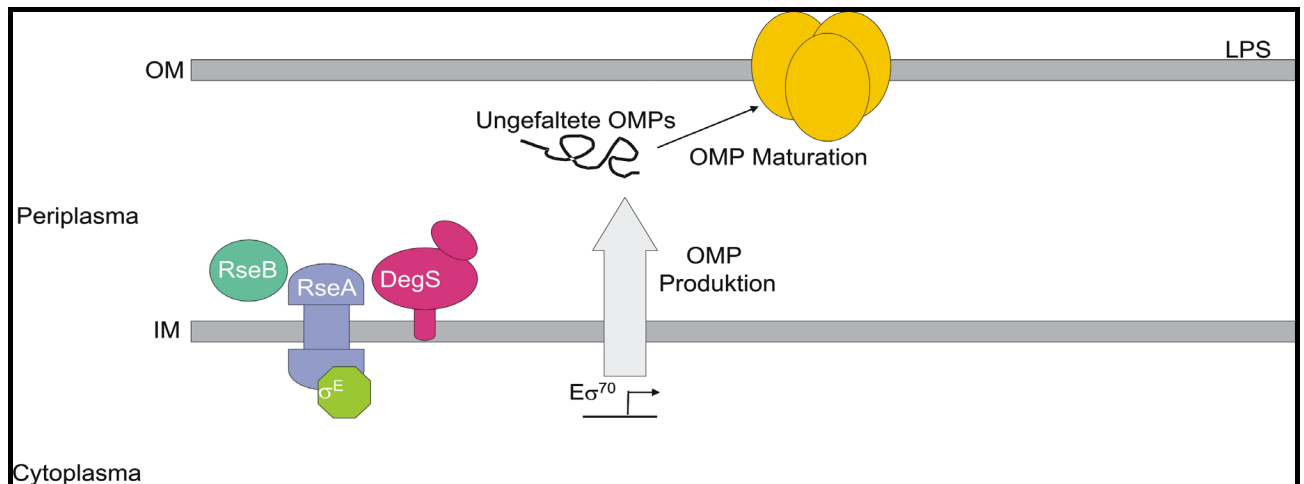


Abb. 2.7.a σ^E Transkriptionsregulation unter stressfreien Bedingungen

Bei optimalen Wachstumsbedingungen erfolgt die allgemeine Genexpression unter der Kontrolle des „housekeeping“ Sigmafaktors σ^{70} . Die unter Kontrolle dieses Sigmafaktors stehenden Außenmembranproteine werden ins das Periplasma transportiert, wo ihre Maturation erfolgt. Der alternative Sigmafaktor RpoE (σ^E) wird durch Bindung an den RseA/RseB Komplex inhibiert. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid; OMP, Außenmembranprotein

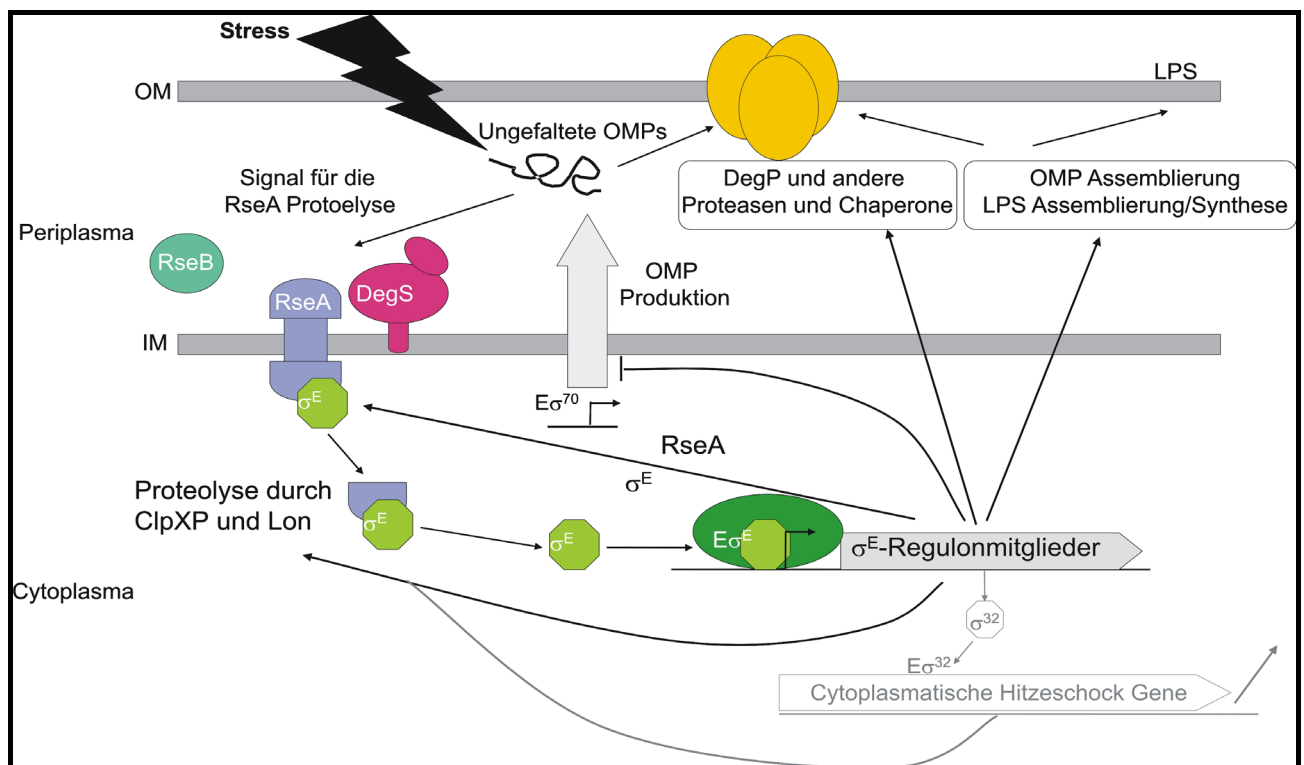


Abb. 2.7.b σ^E Transkriptionsregulation unter Stressbedingungen (Gross et al., 2007)

Unter Stressbedingungen in Form von erhöhten Mengen an ungefalteten Außenmembranproteinen erfolgt durch Bindung der C-Termini an DegS der primäre Schnitt des Antisigmafaktors RseA. Durch Abtrennung von RseB und weiterer Proteolyseschritte durch RseP, ClpXP und Lon erfolgt die Freisetzung des Hitzeschock Sigmafaktors RpoE (σ^E). σ^E fördert die Expression von *degP* und anderen Genen zur Stressantwort, sowie RseA und σ^E selbst. Zusätzlich führt die σ^E Transkriptionsregulation zu einer Herabregulation der Expression von Außenmembranproteinen. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid; OMP, Außenmembranprotein.

2.6. Zielsetzung der Arbeit

Wie durch die bisherigen Forschungsarbeiten gezeigt werden konnte, ist DegP als Hitzeschockprotein ein wichtiger Faktor bei der Stressantwort von *E. coli*. Die Arbeiten von Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) haben gezeigt, dass DegP eine Doppelfunktion als Protease und Chaperon in einem temperaturabhängigen Verhältnis aufweist. Ziel dieser Arbeit ist es, eine vollständige biochemische Charakterisierung der Proteasefunktion von DegP durchzuführen. Hierfür muss als erstes ein quantifizierbares Substrat für DegP entwickelt und ein Enzymtest etabliert werden. Nach der Analyse der Proteasefunktion unter verschiedenen Stressbedingungen wie hohen Salzkonzentrationen und Veränderungen im pH-Wert, soll ebenfalls der Einfluss von Stresssignalen im Enzymtest untersucht werden. Zu solchen Stresssignalen gehören *in vivo* fehlgefaltete Proteine und kleine Peptide, die gehäuft unter Stressbedingungen auftreten. Hierdurch sollen weitere Aufschlüsse über die prinzipielle Funktionsweise und die Aufgabe von DegP in der Stressantwort gewonnen werden.

Im weiteren sollen Inhibitoren für DegP entwickelt werden, die am aktiven Zentrum von DegP binden, wodurch weitere Rückschlüsse auf die Spezifität der Protease DegP gewonnen werden können. Da von DegP bisher nur die proteolytisch inaktive Struktur gelöst werden konnte (Krojer *et al.*, 2002), könnten die entwickelten Inhibitoren dazu benutzt werden, DegP im aktiven Zustand zu fixieren und so die DegP Struktur im proteolytisch aktiven Zustand mit der Kooperationsgruppe am IMP in Wien zu lösen.

Die sogenannte Loop Triade von DegP ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Proteasefunktion. Durch die Einführung spezieller Punktmutationen innerhalb des für die Stabilität der Loop Triade essentiellen LA Loops, soll der funktionelle und strukturelle Einfluss dieser weitergehend untersucht werden. Hierfür sind vergleichende Untersuchungen mit dem wildtypischen DegP vorgesehen. Neben den bereits etablierten Methoden der *in vivo* Komplementation und des Caseinverdaus sind auch die Analyse mittels des zu entwickelnden Enzymtests, sowie die Oligomerisierungsanalysen durch Gelfiltration, Cross-Link Methode und analytischer Ultrazentrifugation geplant.

Durch die detaillierte Charakterisierung von DegP könnten ebenfalls allgemeine Rückschlüsse auf die Funktionsweise von Proteasen mit PDZ Domäne wie Tsp und von den humanen HtrA Familienmitgliedern, die an Alzheimer- und Krebserkrankungen beteiligt sind, gewonnen werden.

3. Material

3.1. Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysis“. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem „water purification system EPA Esta. 41237-MA-1“, Millipore GmbH, Neu-Isenburg) verwendet, nachfolgend als „Aqua dest.“ bezeichnet, welches in regelmäßigen Abständen bezüglich pH-Wert und Konduktivität überprüft wurde.

3.2. Bakterienstämme und Plasmide

3.2.1. *E. coli* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft
CLC198	MC4100 <i>degP::tet</i>	Department of Molecular Biology, Princeton University, USA
DH5α	<i>F</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15], <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , (<i>res</i> ⁻ , <i>mod</i> ⁺), <i>deoR</i>	Hanahan, 1983
DHB4	MC1000 Δ <i>malF3</i> Δ <i>phoA</i> (<i>Pvull</i>) <i>phoR</i> is <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>thi rps L F'lac'Q pro</i>	Boyd et al., 1987
JWK2203	BW25113 <i>lacIq</i> <i>rrnBT14</i> <i>DlacZwj16</i> <i>hsdR514</i> <i>DaraBADAH33</i> <i>rhaBADLD78</i> , <i>ompC::kan</i>	Keio-Collegen, Japan
KU98	DHB4 <i>degP::kan</i> <i>treA::spec</i>	Laborsammlung
MA001	CLC198 <i>degP::tet</i> <i>ompC::kan</i>	Diese Arbeit
MC4100	<i>F</i> ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>araF-leu</i>) <i>U169</i> <i>rpsL150</i> <i>deoC1</i> <i>relA1</i> <i>ptsF25</i> <i>flbB5301</i> <i>rbsR</i>	Casadaban, 1976

3.2.2. Vektoren und Plasmide

3.2.2.1. Vektoren

Vektor	Relevanter Genotyp	Herkunft
pCS19	Expressionsvektor mit C-terminalem His-Tag und lacIq-Gen, amp	Spiess, 1999

3.2.2.2. Plasmide

Plasmid	Relevanter Genotyp	Herkunft
pCS20	pCS19 mit <i>degP</i> , amp	Spiess, 1999
pCS21	pCS19 mit <i>degP</i> _{S210A} , amp	Spiess, 1999
pAB31	pCS19 mit <i>degP</i> _{N45F} , amp	Beil, 2003
pAB32	pCS19 mit <i>degP</i> _{N45F,Q47F} , amp	Beil, 2003
pAB33	pCS19 mit <i>degP</i> _{N45F,Q47F,Q48F} , amp	Beil, 2003
pAB34	pCS19 mit <i>degP</i> _{N45F,S210A} , amp	Beil, 2003
pAB35	pCS19 mit <i>degP</i> _{N45F,Q47F,S210A} , amp	Beil, 2003
pAB36	pCS19 mit <i>degP</i> _{N45F,Q47F,Q48F,S210A} , amp	Beil, 2003

3.3. Nukleinsäuren

Nukleinsäure	Herkunft
2-log DNA Ladder	NEB, Beverly, USA

3.4. Proteine

3.4.1. Enzyme

Enzym	Herkunft
Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, München
DegP	Diese Arbeit
DNAse I	Sigma-Aldrich, München
Elastase	Sigma-Aldrich, München
Kallikrein	Sigma-Aldrich, München
Lysozym	Sigma-Aldrich, München
Plasmin	Sigma-Aldrich, München
Subtilisin	Sigma-Aldrich, München
Thrombin	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Sigma-Aldrich, München

3.4.2. Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme, Puffer und benötigte Pufferzusätze wurden von der Firma New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

3.4.3. Sonstige Proteine

Protein	Herkunft
β-Casein	Sigma-Aldrich, München
Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW	GE Healthcare, München
MalS	gereinigt und denaturiert von Dr. Merdanovic

Protein	Herkunft
NuPAGE Novex Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe
OmpC	Diese Arbeit
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	NEB, Beverly, USA

3.4.4. *p*-Nitroanilin Peptide

p-Nitroanilin	Herkunft
Bz-R-pNA	Bachem, Weil am Rhein
DPMFKLV-pNA	CGC, Dortmund
GLATGNVSTAELQDATPA-pNA	IMP, Wien
KGKASVPGAGLV-pNA	IMP, Wien
KGKNSGSGATPV-pNA	IMP, Wien
PMMGKASPV-pNA	CGC, Dortmund
PVFNTLPMMGKASPV-pNA	CGC, Dortmund
SDAEFRHDSGYEV-pNA	IMP, Wien
SGRVVPGYGHA-pNA	IMP, Wien
SPLPEGV-pNA	IMP, Wien
SPMFKGV-pNA	CGC, Dortmund
STDGGV-pNA	IMP, Wien
VFNTLPMMGKASPV-pNA	CGC, Dortmund

3.4.5. *Inhibierende Peptide*

Inhibitor	Herkunft
IWNTLN SG RVVPGTGHA-CMK	IMP, Wien
DPMFKLV-Boronsäurederivat	CGC, Dortmund

Inhibitor	Herkunft
PMMGKASPV-CMK	CGC, Dortmund
PVFNTLPMMGKASPV-CMK	CGC, Dortmund
SGRVVPGYGHA-CMK	IMP, Wien
SPMFGV-Boronsäurederivat	CGC, Dortmund
SPMFGV-CMK	CGC, Dortmund
VFNTLPMMGKASPV-CMK	CGC, Dortmund

3.4.6. Aktivierende Peptide

Peptid	Herkunft
DKVLVWAGQQ	IMP, Wien
DNRDGNVYDF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYFF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYGF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYIF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYKF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYLF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYQF	IMP, Wien
DNRDGNVYSF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYWF	CGC, Dortmund
DNRDGNVYYF	CGC, Dortmund
IVALGLVYQF	IMP, Wien
YTMKAAGLGK	IMP, Wien

3.5. Antiseren

Antiserum	Herkunft
Rabbit-Anti-DegP-MBP	Laborsammlung
Rabbit-Anti-MaIS	Laborsammlung

Antiserum	Herkunft
Mouse-Anti-OmpC	Laborsammlung
Anti-Mouse-IgG-AP	Sigma-Aldrich, München
Goat-Anti Rabbit Immunoglobulin/AP	Dako Cyomation

3.6. Feinchemikalien

Die für Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) und wiesen den höchsten Reinheitsgrad auf.

3.7. Diverses

Dialysiermembran ZelluTrans T1	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter	Machery-Nagel, Düren
Membranfilter VS 0,025 µm	Millipore, Neu Isenburg
Ni-NTA Superflow	Quiagen, Hilden
NuPage Novex Midi Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid-Kit: Perfect Prep Plasmid Mini	Eppendorf, Hamburg
Vivaspin 15R, 30 kDa	Vivascience, Stonehouse, UK

3.8. Geräte

Autoklav	BeliMed, Mühldorf am Inn
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Elektroporation Micropulser	Bio-Rad, München
FPLC-Äkta	GE Healthcare, München

French Press	Thermo, Schwerte
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Horizontalschüttler	Grant Böckler, Cambridge, GB
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
ITC VP-ITC Calorimeter	MicroCal, Wolverton Mill, GB
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen
pH-Meter	Schott, Mainz
XCell4 SureLock Midi-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Scanner	UMAX, Astra 4000U
Spannungsgerät PowerPac 200	Bio-Rad, München
Spektrometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Spektrometer Smart Spec Plus	Bio-Rad, München
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter, Krefeld
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Waagen	Kern, Balingen-Frommern
Western Blot Apparaturen	Bio-Rad, München

4. Methoden

4.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden

Beim Umgang mit den Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Bei allen Arbeitsgängen wurden die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit GvOs (S1) eingehalten. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

4.1.1. Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (BeliMed, 20 min, 120°C, 2-3 bar) autoklaviert. Temperaturinstabile Lösungen wurden mittels einer 0,2 µm Membran (FB 030/3) sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

4.1.2. Haltung und Sicherung von Zellen und Plasmiden

4.1.2.1. Herstellung von Flüssigmedien und Nährböden

Für die Herstellung der verschiedenen Flüssigmedien wurden die Substanzen eingewogen, mit Aqua dest. auf einen Liter aufgefüllt und autoklaviert. Für Agarplatten wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar zugegeben. Gegebenenfalls wurden die Medien und Platten mit selektiven Antibiotika versetzt.

NZA-Medium:

NZ-Amine	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

4.1.2.2. Medienzusätze**4.1.2.2.1. Antibiotika**

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Antibiotika in bidestilliertem Wasser gelöst und sterilisiert. Alle Zusätze waren als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und wurden den Medien erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf mindestens 50°C zugefügt.

Substanz	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	200 mg/ml	200 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml

4.1.2.2.2. Zusätze

Induzierbare Stämme wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 0,01 mM Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) induziert. Das IPTG wurde in bidestillierten Wasser gelöst und sterilfiltriert.

4.1.2.3. Ausstreichen von Bakterienstämmen

Das Ausstreichen von Bakterienstämmen auf NZA-Agarplatten erfolgte aus gefrorenen DMSO-Kultur. Eine hitzesterilisierte Impföse wurde kurz über die gefrorene Lösung gekratzt und die Bakterien dann auf der NZA-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.1.2.4. Anzucht von Flüssigkulturen

Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien mittels Impföse von einer NZA-Agarplatte in 3 ml NZA-Medium, welches gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert war, überimpft und auf einem Rundschüttler (200 rpm und 37°C) inkubiert.

4.1.2.5. Lagerung von Stämmen

Die Aufbewahrung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte als DMSO-Kultur bei -80 °C. Hierzu wurde eine Flüssigkultur mit einer Endkonzentration von 7-20 % (v/v) DMSO versetzt und die Suspension direkt eingefroren.

4.1.2.6. Lagerung von Plasmiden

Die Aufbewahrung der verwendeten Plasmide erfolgte in einem Niedrigsalz-Puffer (Elutionspuffer von Perfectprep Plasmid Mini[®], Eppendorf) bei -20°C bzw. für eine längere Lagerungsdauer bei -80°C.

4.1.3. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zellzahl von *E. coli* Flüssigkulturen wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Bio-Rad-Photometer bestimmt. Nach Miller (Miller, 1972) entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa 107 µg/ml Protein. Die Zellzahl dieser optischen Dichte beträgt ca. 10⁹ Zellen pro ml.

4.1.4. Transformation

4.1.4.1. TSS-Transformation

Bei Transformationen, die keine hohe Effizienz erfordern, wurde die sogenannte TSS-Transformation ("transformation and storage solution") nach Chung *et al.* (Chung *et al.*, 1989) durchgeführt.

Pro Ansatz wurden 50 µl Empfängerzellen einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit 50 µl 2 x TSS gemischt und für einige Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen sind sofort kompetent. Die Transformation erfolgte durch die Zugabe von 1 - 2 µl Plasmid-DNA und einer Inkubation auf Eis für weitere 30 min. Zur phänotypischen Expression wurde 1 ml NZA-Medium hinzugefügt und der Ansatz 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf einer Selektionsplatte ausplattiert und über Nacht bei der entsprechenden Temperatur bebrütet.

2x TSS:

PEG-6000	20 % (w/v)
DMSO	10 % (v/v)
MgSO ₄	100 mM

Das PEG-6000 wurde in NZA-Medium gelöst und anschließend autoklaviert. Das DMSO und sterilfiltriertes MgSO_4 wurden erst nach dem Autoklavieren hinzupipettiert. Die Lösung konnte für mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt werden.

4.1.4.2. Elektroporation

4.1.4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Elektroporation

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 500 ml NZA-Medium mit 5 ml der entsprechenden üN-Kultur (4.1.2.3.) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 kultiviert. Nach einer 15-30 minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4.000 rpm (4°C) für 15 min. Das Zellpellet wurde in 500 ml kaltem Aqua dest. resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 250 ml kaltem Aqua dest. aufgenommen und wieder zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 20 ml 10% Glycerol resuspendiert, zentrifugiert und schließlich in 0,5 ml 10% Glycerol aufgenommen. Nach dem Aliquotieren (40 µl Aliquots) wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.4.2.2. Transformation durch Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte nach Maniatis *et al.* (Maniatis *et al.*, 1982). Für die Transformation wurden 40 µl kompetente *E.coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 1-4 µl (entsprechend ca. 5-7 ng) Plasmid-DNA vermischt. Die Zellen wurden in eine kalte Elektroporationsküvette überführt und die Transformation durch Elektroschock im Micro Pulser (Bio-Rad) (25 mF; 2,5 kV; 200 Ω) induziert. Anschließend wurde der Ansatz mit 950 µl NZA-Medium vermischt, in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert.

Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (1 min, 14.000 rpm, RT), die Zellen im Rücklauf resuspendiert und anschließend ebenfalls auf der entsprechenden Selektivagarplatte ausplattiert.

4.1.4.3. Chemische Transformation

4.1.4.3.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation durch Hitzeschock

Der zu transformierende *E. coli* Stamm wurde in einer üN-Kultur bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Es wurden 250 ml NZA-Medium mit 2,5 ml *E. coli* Kultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{580} = 0,5-0,7$) inkubiert. Im Anschluss wurde die Ausgangskultur 10 min auf Eis gelagert und anschließend 10 min bei 4.000 rpm in einer Kühlzentrifuge (4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 80 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 10 min bei 4.000 rpm bei 4°C wurden die *E. coli* Zellen in 20 ml Transformationspuffer aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden nach Zugabe von DMSO (Endkonzentration 7 % (v/v)) 10 min auf Eis gestellt, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformationspuffer :

CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
PIPES	10 mM
MnCl ₂	55 mM
pH 6,7	

Das sterilfiltrierte MnCl₂ wurde erst nach dem Autoklavieren hinzupipettiert.

4.1.4.3.2. Transformation der kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA durch Hitzeschock

Jeweils 200 µl kompetente Zellen wurden mit DNA-Lösung (Ligationsansätze oder isolierte Plasmid-DNA, 1-100 µl) vermischt und 10-30 min auf Eis gelagert. Nachdem ein 1minütiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt wurde, wurden 800 µl NZA-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz wurde für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl des Transformationsansatzes auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert.

4.1.5. Bakterienstammkonstruktion durch P1-Transduktion

4.1.5.1. Herstellung eines P1-Lysats

Eine üN-Kultur des für die Herstellung eines Lysats ausgesuchten Stammes wurde 1:100 in 5 ml NZA-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,4 angezogen. Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden der Kultur 20 µl 1 M CaCl₂ (Endkonzentration 5 mM) und 10 µl eines P1vir-Lysats des Stammes MC4100 zugefügt und diese weiterhin bei der entsprechenden Temperatur inkubiert bis die Lyse erfolgte. Dies ist am Aufklaren der Zellsuspension zu erkennen. Nach dem Zumischen von einigen Tropfen Chloroform wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 4.000 rpm, RT). Der gewonnene Überstand wurde in einem Glasgefäß mit Schraubverschluß bei 4 °C aufbewahrt.

4.1.5.2. P1-Transduktion

Die P1-Transduktion erfolgte nach Silhavy *et al.* (Silhavy *et al.*, 1984). Die Kontrolle auf eine erfolgreiche Transduktion des gewünschten Genabschnitts erfolgte durch das Überprüfen der damit verbundenen phänotypischen Eigenschaft.

4.1.5.3. Konstruktion von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sind unter 3.2.1. *E.coli* Stämme aufgeführt. Der neue Stamm MA001 wurde wie folgt konstruiert:

Der Stamm entstand durch eine P1-Transduktion von CLC198 mit einem P1-Lysat aus JWK2203 (*ompC::kan*) und anschließender Selektion auf die Tetracyclin-Resistenz.

4.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.2.1. Plasmid-DNA Präparation

Für die Isolierung analytischer Mengen Plasmid-DNA für nachfolgende Versuche wurde ein Minipräp mittels „Perfectprep Plasmid Mini®“ von Eppendorf durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der Proben durch UV/VIS-Spektroskopie (4.2.5.1.).

4.2.2. Restriktionshydrolysen der Plasmid-DNA

Bei den in dieser Arbeit benutzten Restriktionsenzymen handelte es sich um Endonukleasen des Typs II (Zabeau und Roberts, 1979). Alle Restriktionsenzyme wurden bezüglich Aktivität, Inkubationstemperatur und Pufferbedingungen den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

Die elektrophoretische Analyse der entstandenen Restriktionsfragmente wurde ohne weitere Aufreinigung der Ansätze durchgeführt.

4.2.3. Gelelektrophorese

4.2.3.1. Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung doppelsträngiger DNA wurden 0,8 bis 1,2%ige (w/v) horizontale Agarosegele verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Die aufgekochte Agarosegellösung wurde nach Abkühlung auf ca. 60°C als Flachbettgel gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer.

Die DNA Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen 5x TAE-Probenpuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde die DNA für 30 min in einem Ethidiumbromidbad inkubiert. Die DNA im Gel wurde mittels Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele mittels SW-Kamera mit entsprechendem Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters ausgedruckt bzw. auf dem angeschlossenen Computer gespeichert.

TAE-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,5	40 mM
EDTA	2,5 mM

4.2.3.2. SDS-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgelsystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) benutzt. Im 2,5%igen Sammelgel wurden die Proteine auf eine gemeinsame Laufhöhe gebracht. Im 12%igen Trenngel erfolgte dann die Trennung nach dem Molekulargewicht.

Die Proteinproben (20 µl) wurden zunächst mit 30 mM DTT und ¼ Volumen 4x SDS-Probenpuffer vermischt und ca. 5 min aufgekocht. Nach Abkühlen auf Eis wurden

jeweils 10 μ l der Proteine und des Markers bei einer konstanten Spannung von 150 V aufgetrennt.

12%iges SDS-Gel:

Lösung	12%iges Trenngel	2,5%iges Sammelgel
Puffer A	2,5 ml	---
Puffer B	---	2,5 ml
Acrylamid (30%)	5 ml	1,1 ml
H ₂ O	2,5 ml	6,5 ml
TEMED	20 μ l	40 μ l
APS	50 μ l	80 μ l

Puffer A:

Tris/HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4%

Puffer B:

Tris/HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4%

Acrylamid (30%):

Rotiphorese Gel 30

4x SDS-Probenpuffer:

Tris/HCl, pH 6,8	0,24 M
SDS	8%
Glycerol	40%
Bromphenol Blau	0,04%
DTT	30 mM

10x Elektrophoresepuffer:

Tris/HCl, pH 8,8	333 mM
SDS	1%
Glycine	1,92 mM

APS:

APS	10%
-----	-----

4.2.3.3. Tris-Tricin Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 1-100 kDa unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Tris-Tricin Gel nach Schagger und Jagow (Schäger und Jagow, 1987) durchgeführt. Hierfür wurden die zu analysierenden Proteinproben in 4x Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Das Gel bestand aus 3 Bereichen, dem Trenn-, Spacer- und Sammelgel, die in einem Verhältnis 2:1:1 gegossen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 1 h bei 30 V, dann 1 h bei 70 V und abschließend bei 150 V und 4°C. Im Anschluss erfolgte eine Coomassie-Blau Färbung.

Tris-Tricin Gel:

Lösung	12,5% Trenngel	10% Spacergel	6% Sammelgel
37,5% Acrylamid/ 1% Bisacrylamid	3,3 ml	1,33 ml	0,8 ml
Gelpuffer	3,5 ml (1 M)	1,75 ml (1 M)	1,25 ml (0,75 M)
Glycerol (14%)	1,44 ml	-	-
Aqua dest.	1,7 ml	1,89 ml	2,92 ml
10% APS	50 µl	25 µl	25 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Gelpuffer:

Tris/HCl, pH 8,45	4 M
SDS	0,3%

Kathodenpuffer:

Tris Base	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1%

Anodenpuffer:

Tris/HCl, pH 8,9	0,2 M
------------------	-------

4x Probenpuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 6,8	4 ml
Glycerol	4,8 ml
SDS	1,6 g
Coomassie Brilliant Blau G250	4 mg
Aqua dest.	ad 10 ml
DTT (frisch hinzugeben)	0,05 M

4.2.4. Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen**4.2.4.1. Coomassie-Blau Färbung**

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden Proteine im Polyacrylamidgel mittels Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurde das Gel zunächst 30 sec in Puffer A in der Mikrowelle erhitzt (400 W) und 5 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Gel jeweils 30 sec in Puffer B und C erhitzt (400 W) und abschließend 1 h in Puffer D entfärbt.

Puffer A:

Isopropanol	25% (v/v)
Acetat	10% (v/v)
Coomassie R250	0,05% (w/v)

Puffer B:

Isopropanol	10 % (v/v)
Acetat	10% (v/v)
Coomassie R250	0,005% (w/v)

Puffer C:

Acetat	10% (v/v)
Coomassie R250	0,002% (w/v)

Puffer D:

Acetat	10% (v/v)
--------	-----------

4.2.4.2.Silberfärbung

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden Proteine im Polyacrylamidgel mittels der von Beidler *et al.* (Beidler *et al.*, 1982) beschriebenen Methode der Silberfärbung angefärbt. Diese Methode erlaubt Nachweise in ng-Mengen. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese in Fixierer I unter leichtem Schütteln mindestens 10 min fixiert und anschließend in der Silbernitratlösung 20 min gefärbt. Danach wurden die Gele dreimal für jeweils 20-60 sec in Aqua dest. (3.1.) gewaschen. Im Folgenden wurden die Gele in die Entwicklerlösung überführt, in welcher sie solange inkubiert wurden, bis die Banden gut sichtbar waren. Nach Fixierung für 10 min in Fixierer II wurde das Gel in Folie eingeschweißt und zur Dokumentation eingescannt (UMAX, Astra 4000U).

Fixierer I:

Ethanol	10% (v/v)
Essigsäure	0,5% (v/v)

Silbernitratlösung

Silbernitrat	0,19% (w/v)
--------------	-------------

Entwickler:

NaOH	15 g/l
Natriumborhydrid	0,08 g/l
Formaldehyd	0,148% (v/v)

Fixierer II:

Natriumcarbonat	0,75% (w/v)
-----------------	-------------

4.2.4.3. Western-Blot**4.2.4.3.1. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen**

Die Proteine wurden mit Hilfe einer Transferapparatur der Firma Bio-Rad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Übertragung erfolgte 1 h bei 100 V in Transferpuffer.

Transferpuffer:

Tris/HCl, pH 8,3	15 mM
Glycin	120 mM
Methanol	20% (v/v)
SDS	0,2% (w/v)

4.2.4.3.2. Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran für 1 h in Blockierungslösung auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Die Temperatur variierte je nach Antikörper. Anschließend erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden Antikörper. Durch dreimaliges Waschen (je 5 min) der Membran in TBST wurden die überschüssigen ungebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Es folgte eine Inkubation der Membran mit dem sekundären

Antikörper (0,5-1 h bei RT). Der sekundäre Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen (je 5 min) in TBST entfernt. Die Detektion erfolgte durch eine 5 minütige Inkubation in AP-Puffer und einer anschließenden Entwicklung in Färbelösung. In der unten aufgeführten Tabelle sind die verwendeten Antikörper und deren Anwendung zusammenfassend dargestellt.

Verwendete Antikörper:

Primärer Antikörper	Konzentration/ Bedingungen	Blockierungs- lösung	Sekundärer Antikörper
Anti-DegP	1:20.000 in TBST + 2% BSA; 1 h; RT	TBST + 2% BSA; 1 h; RT	Anti-rabbit AP 1:20.000 in TBST + 2% Milchpulver; 30 min; RT
Anti-OmpC	1:20.000 in TBST + 2% BSA; 1 h; RT	TBST + 2% BSA; 1 h; RT	Anti-rabbit AP 1:20.000 in TBST + 2% Milchpulver; 30 min; RT
Penta-His Antibody	1:2.500 in TBST + 3% BSA; 1 h; RT	TBST + 2% BSA; 1 h; RT	Anti-mouse IGG AP 1:20.000 in TBST + 5% Milchpulver; 1 h; RT

TBS:

Tris/HCl, pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM

TBST:

TBS	
Tween-20	0,05%

AP-Puffer:

Tris/HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Färbelösung:

AP-Puffer	10 ml
NBT (50 mg/ml in 70% DMF)	66 µl
BCIP (50 mg/ml in 70% DMF)	33 µl

4.2.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen mittels UV/VIS-Spektroskopie

4.2.5.1. UV/VIS-Spektroskopie: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen wurde in einem Smart Spec Plus Photometer (Bio-Rad) mit einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Um im linearen Messbereich zu arbeiten, wurden die zu messenden Proben so verdünnt, dass ihre Absorption im Bereich zwischen 0,1 und 1 Absorption lag. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel. Zur Berechnung der Konzentration wurden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors folgende Beziehungen verwendet:

$$1,0 A_{260} = 37 \mu\text{g einzelsträngige Nukleinsäure/ml}$$

$$1,0 A_{260} = 50 \mu\text{g doppelsträngige Nukleinsäure/ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 220 bis 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über mögliche Verunreinigungen der Nukleinsäurelösung. Für reine

Präparationen sollte der A_{260}/A_{280} -Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Kontaminationen durch Proteine und Phenol führen zu deutlich geringeren Quotienten.

4.2.5.2. UV/VIS-Spektroskopie: Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde ein Bradford-Microassay (Bio-Rad) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 5-20 μl Proteinlösung mit 780-795 μl Aqua dest. und 200 μl Bradford-Reagenz versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Probe bei 595 nm im Spektralphotometer Smart Spec Plus (Bio-Rad) gemessen, welches gegen 780-795 μl Aqua dest., 5-20 μl des sich in der Proteinlösung befindlichen Puffers und 200 μl Bradford-Reagenz kalibriert war. Anhand einer zuvor hergestellten Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen (1-15 μg BSA) wurde dann die Konzentration der zu analysierenden Probe durch Interpolation ermittelt.

4.3. Proteinbiochemische Methoden

4.3.1. Dialyse von Proteinlösungen

Zur Entsalzung von Proteinlösungen im präparativen Maßstab wurde eine Dialyse mittels Dialyseschlauch (Porengröße 6.000-8.000; ZelluTrans (Roth)) gegen den gewünschten Puffer durchgeführt. Die verwendeten Dialyseschläuche wurden vor Benutzung 30 min in einer Na_2CO_3 -Lösung gekocht, zweimal mit Aqua dest. gespült und weitere 15 min in Aqua dest. gekocht. Anschließend konnten die Schläuche verwendet oder bei 4°C in 50% Ethanol gelagert werden. Die Dialyse der Proben erfolgte für mindestens 2 h unter Rühren bei 4°C.

4.3.2. TCA-Proteinfällung

Die Probe wurde mit NaDOC (Endkonzentration 0,1%) gemischt. Danach erfolgte eine Zugabe von TCA auf eine Endkonzentration von 10%. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Probe bei 13.000 rpm für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Aceton überschichtet und gevortext. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei -20°C und ein Zentrifugationsschritt mit 13.000 rpm bei 4°C für 15 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und das Pellet in der SpedVac (Eppendorf) bei RT getrocknet.

4.3.3. Gesamtproteinisolierung aus *E. coli*

Eine *E. coli* Testkultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und 1 ml Kultur entnommen. Es folgte ein 3 minütiger Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, RT), anschließend wurde das Zellsediment in 60 µl Aqua dest. resuspendiert. Es wurden 20 µl 4x SDS-Probenpuffer sowie DTT in einer Endkonzentration von 30 mM dazugegeben und die Zellen 5 min bei 99°C im Thermoblock inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese (4.2.3.2.)

4.3.4. Proteinreinigung

4.3.4.1. Proteinreinigung von Proteinen mit His-Tag (DegP)

4.3.4.1.1. Anzucht des Überexpressionsstamms MA001/pCS20 und MA001/pAB31-36

Ein entsprechendes Selektionsmedium wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Rundschüttler (innova 44; New Brunswick Scientific) inkubiert. Eine üT-Kultur wurde 1:100 angeimpft und bei 28°C inkubiert. Die Kultur

wurde mit 10 μ M IPTG über Nacht induziert. Bei den DegP Mutanten DegP_{Q45F}, DegP_{Q45F,N47F} und DegP_{Q45F,N47F,N48F}, die einer starken Autoproteolyse unterliegen, fand eine Induzierung mit 1 mM IPTG für 3 h bei 28°C statt.

4.3.4.1.2. Zellaufschluss des Überexpressionsstamms MA001/pCS20 und MA001/pAB31-36

Die induzierte Kultur wurde bei 4°C mit 6.000 g (Avanti J-E; Beckman Coulter) pelletiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte im Mikrofluidizer (M-110L Microfluidizer Processor; Microfluidics) bei einem Druck von 12 bar.

4.3.4.1.3. DegP Reinigung über Ni-NTA Superflow (Qiagen)

Zur Reinigung von Proteinen wurde die automatisierte FPLC-Anlage Äkta von GE Healthcare verwendet. Als Leersäule zum Packen von Ni-NTA Superflow Material der Firma Qiagen wurde eine Laborsäule XK 16/20 der Firma GE Healthcare verwendet.

Die Proteine DegP, DegP_{N45F}, DegP_{N45,Q47F}, DegP_{N45,Q47F,Q48F} und die dazugehörigen S210A Mutanten wurden aus dem Stamm MA001, der die entsprechenden Plasmide pCS20, pCS21 und pAB31-36 enthält, gereinigt. Da der Stamm MA001 kein funktionelles chromosomales *degP* trägt, ist auszuschließen, dass sich Oligomere aus chromosomalen und plasmidkodierten DegP Monomeren bilden.

Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Sedimentation der Zelltrümmer (30 min, 25.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule aufgetragen (Flußrate: 1,5 ml/min). Nichtbindende Proteine wurden mit 150 ml Lysepuffer eliminiert (Flußrate: 3 ml/min). Das gebundene Protein wurde mit einem Imidazolgradienten (0-100% Elutionspuffer in ca. 750 ml) eluiert (Flußrate: 3 ml/min). Die Proteine eluierten bei einer Imidazolkonzentration von 75 bis 150 mM.

Die Reinheit des eluierten Proteins wurde durch ein SDS-Gel mit Coomassiefärbung ermittelt. In den Hauptfraktionen konnte eine Reinheit von > 95% dokumentiert werden.

Bei Bedarf wurden die Proben über Vivaspin-Röhrchen (Vivaspin 15R, 30kD, Vivascience, Stonehouse, UK) aufkonzentriert. Zur Aufbewahrung wurden die Proteine aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lysepuffer:

NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	150 mM

Elutionspuffer:

NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	150 mM
Imidazol	150 mM

4.3.4.2. OmpC Reinigung nach Arockiasamy und Krishnaswamy (2000)

4.3.4.2.1. Anzucht des Überexpressionsstammes DHB5 α /pTrcOmpC

Ein entsprechendes Selektionsmedium wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Rundschüttler (innova 44; New Brunswick Scientific) inkubiert. Eine üT-Kultur wurde 1:100 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Eine Induktion mit 1 mM IPTG für 3 h fand in der logarithmischen Wachstumsphase statt.

4.3.4.2.2. Zellaufschluss des Überexpressionsstammes DHB5 α /pTrcOmpC

Die induzierte Kultur wurde bei 4°C mit 6.000 g (Avanti J-E; Beckman Coulter) pelletiert. Das Pellet wurde in 50 mM Tris, pH 7,7 aufgenommen. Der Aufschluss

erfolgte im Mikrofluidizer (M-110L Microfluidizer Processor; Microfluidics) bei einem Druck von 12 bar.

4.3.4.2.3. *OmpC* Reinigung aus dem Überexpressionsstamm *DHB5 α /pTrcOmpC*

Der Zellaufschluss wurde bei 50.000 g (Avanti J-E; Beckman Coulter) sedimentiert. Das Pellet von je 1 l Kultur wurde in 25 ml Puffer I aufgenommen und für 18 h bei 37°C geschüttelt (innova 44; New Brunswick Scientific). Die Suspension wurde bei 25.000 g für 30 min bei RT sedimentiert und das Pellet gesammelt. Dieses Pellet wurde in 7 ml Puffer II resuspendiert und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 25.000 g für 30 min bei RT. Das dabei gewonnene Pellet wurde in 3 ml Puffer III aufgenommen und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde für 20 min bei 25.000 g und RT abzentrifugiert. Der porinreiche Überstand wurde gesammelt. Der obere Schritt wurde ein weiteres Mal mit dem Pellet wiederholt. Die Überstände wurden anschließend vereint.

Puffer I:

Tris/HCl, pH 7,7	50 mM
MgCl ₂	10 mM
SDS	2% (w/v)

Puffer II:

Tris/HCl, pH 7,7	50 mM
MgCl ₂	10 mM
EDTA	5 mM
β -Mercaptoethanol	0,05% (v/v)
SDS	1% (w/v)

Puffer III:

Tris/HCl, pH 7,7	50 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	5 mM
β-Mercaptoethanol	0,05% (v/v)
SDS	0,2% (w/v)

4.3.5. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von DegP und DegP-Derivaten

4.3.5.1. Gelfiltration

Die multimere Organisation von DegP und den DegP-Derivaten mit und ohne Aktivatorpeptid konnte durch eine Gelfiltration bestimmt werden. Hierfür wurde eine Superdex200 HR 10/30 Säule bzw. eine Superose6 Säule (GE Healthcare) eingesetzt, die mit Laufpuffer äquilibriert wurde. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min und das Auftragsvolumen der Proben 250 µl. DegP und seine Derivate wurden in Konzentrationen zwischen 0,8 und 3 mg/ml eingesetzt. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgte je nach Versuchsanordnung bei 43°C, RT oder 4°C. Die Eichung der Säule erfolgte nach Anleitung des „Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW“ von GE Healthcare.

4.3.5.2. Cross-Link Methode

Für die Bestimmung der oligomeren Zustände von DegP und den DegP-Derivaten mit und ohne Aktivator wurde die Methode des Cross-Links genutzt. 2 µM DegP wurde allein oder in Kombination mit Aktivatoren im Reaktionspuffer für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Cross-Linkreagenz Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v). Nach der Probenentnahme wurde die Reaktion durch die Zugabe der Stopplösung (1:10) unterbrochen und die Ansätze für

10 min in dieser inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 40°C für 10 min und eine elektrophoretische Auftrennung der Proben mittels NuPAGE Novex Midi Gel (Invitrogen). Im Anschluss wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

Reaktionspuffer:

NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	62,5 mM
---	---------

Stopplösung (10x):

Tris/HCl, pH 8,0	500 mM
------------------	--------

Elektrophoresepuffer:

Tricin	89,5 g
Tris Base	60,6 g
SDS	10 g
ad Aqua dest.	500 ml

4.3.5.3. Analytische Ultrazentrifugation

Die Durchführung der Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe erfolgte in einer Beckman XL-A Zentrifuge, die mit einer Absorptionsoptik ausgestattet war. Für die Messzellen wurden Standard-Aluminium-Doppelsektor-Mittelstücke mit 1,2 cm optischer Weglänge und einem Probenvolumen von 400 µl verwendet.

Nach sorgfältiger Temperatur-Äquilibration erfolgte die Messung bei einer Rotordrehzahl von 30.000 rpm und 30°C. Die Messdaten wurden je nach Bedarf entweder im Absorptions- oder im Intensitätsmodus aufgezeichnet. Bei letzterem können beide Messzellen-Sektoren für Proben benutzt werden, während bei dem Absorptions-Modus der zweite Sektor mit Puffer befüllt werden muss. Die Datenerfassung geschah bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm im „Continuous Mode“ mit einer radialen Auflösung von 0,002 cm. Radiale Scans wurden ohne zeitliche Unterbrechung aufgezeichnet, um eine möglichst große Datenmenge zu gewährleisten. Der mittlere Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Scans einer Messzelle betrug etwa 5 min. Als Probenpuffer

wurde 100 mM Natriumphosphat pH 7,4 verwendet. Die Proteinkonzentration von DegP betrug 1 mg/ml.

Zur Auswertung der Daten wurde das Programmpaket Ultrascan (www.ultrascan.uthscsa.edu/) eingesetzt. Dieses Programmpaket enthält auch die Programmoptionen, die gewonnenen Intensitätsdaten in pseudo-Absorptions-Daten umzuwandeln. Für die Messdaten-Analyse wurde die van-Holde-Weisheit Methode zur Bestimmung der geeigneten Startparameter s_{\min} und s_{\max} für die anschließenden Fitting-Prozeduren verwendet. Mit einer 2-dimensionalen Spektrumanalyse konnte dann sowohl das zeitunabhängige Rauschen aus den Messdaten bestimmt und subtrahiert werden als auch eine Summe von s-Wert-Spezies, welche jeweils zusätzlich zum Sedimentationskoeffizienten durch einen Diffusionskoeffizienten, ein Molekulargewicht und eine Häufigkeit definiert sind, ermittelt werden. Danach erfolgte eine Regularisierung über einen genetischen Algorithmus, welcher nach der optimalen Lösung, gekennzeichnet durch eine minimierte Standardabweichung, mit der niedrigsten Anzahl an einzelnen Spezies sucht: Prinzip der Parsimonie oder Occams Razor. Zuletzt wurde diese Lösung durch eine Monte-Carlo-Analyse statistisch abgesichert. Die notwendige Rechnerkapazität wurde durch die Universität des Texas Health Science Centers in San Antonio zur Verfügung gestellt.

4.3.6. Massenbestimmung mittels Elektrospray-Ionisationsmethode

Zur Massenbestimmung mittels Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) wurde das Gerät LCQ Advantage Max der Firma Thermo Finnigan, welches mit einer Agilent HPLC der Serie 1200 betrieben wird, verwendet. Die Messungen wurden zunächst zwei Minuten isokratisch mit 20% ACN / 80% Wasser und dann mit einem Gradienten über dreizehn Minuten auf 50% ACN / 50% Wasser durchgeführt. Die mobilen Phasen waren mit 0,1% Ameisensäure versetzt. Zur Auftrennung wurde eine Jupiter 4 μ l Proteo 90 Å mit 250 * 4,60 mm von Phenomenex verwendet. Zur Dekonvolution wurde ProMass benutzt.

4.3.7. Aktivitätstests von DegP

4.3.7.1. Spaltung von pNA-Peptiden durch DegP und DegP-Derivate

Die proteolytische Aktivität von Proteasen konnte durch Peptide, die eine C-terminal gekoppelte p-Nitroanilin-Gruppe (pNA) tragen, bestimmt werden. Die Spaltung muss hierfür zwischen der p-Nitroanilin-Gruppe und der damit verknüpften Aminosäure erfolgen. Die Menge des freigesetzten p-Nitroanilin ist ein Maß für die Proteaseaktivität und kann photometrisch quantifiziert werden. Die für eine Bestimmung der proteolytischen Aktivität von DegP verwendeten pNA-Peptide sind unter 3.4.4. *p-Nitroanilin Peptide* aufgeführt. Die zu testenden Peptide wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt und mit 1 µM Protein vermischt. Je nach Versuchsanordnung wurden ebenfalls aktivierende oder inhibierende Substanzen zugegeben und mit dem Protein vorinkubiert. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer auf 100 µl aufgefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm kontinuierlich bei entsprechender Temperatur für 1 h gemessen. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten beruhen auf jeweils mindestens dreimaligen Doppelbestimmungen.

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\Delta A_{405} * V}{c * \epsilon * t} \quad [\text{mol} * \text{mg}^{-1} * \text{min}^{-1}]$$

ΔA_{405} :	Absorptionsänderung bei $\lambda = 405$ nm über den Messungszeitraum
V:	Endvolumen des Reaktionsansatzes [ml]
c:	Konzentration von DegP im Reaktionsansatz [mg/ml]
ϵ :	molarer Extinktionskoeffizient des pNAs [$8.800 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$]
t:	Messzeit [min]

4.3.7.2. Caseinabbau durch DegP und DegP-Derivate

4.3.7.2.1. Abbau von β -Casein durch DegP und DegP-Derivate

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von DegP und DegP-Derivaten wurde 1 μ M DegP mit 4 bzw. 20 μ M β -Casein inkubiert. Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert, wobei in Abständen von 2 min Proben entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert wurden (4.2.3.2.).

4.3.7.2.2. Zymogramm

Um den Abbau von Casein durch DegP nachzuweisen, wurde eine weitere Methode angewendet, bei der das zu testende Protein auf ein nicht denaturierendes Zymogramm-Gel aufgetragen wurde, das Casein enthielt. Der Abbau von Casein wurde anschließend durch eine Caseinanfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das zu testende Protein mit Z-Probenpuffer versetzt und auf das Zymogramm-Gel aufgetragen. Das Gel wurde im TG-Laufpuffer für 100 min einer Spannung von 100 V ausgesetzt und anschließend 30 Minuten bei RT in Renaturierungs-Puffer inkubiert. Danach folgte eine Inkubation in Entwicklungspuffer über Nacht bei 37°C. Nach der Entwicklung erfolgte die Färbung durch eine einstündige Inkubation in Färbelösung und durch eine abschließende Entfärbung für 30 bis 60 min in Entfärbelösung.

Z-Probenpuffer:

Tris/HCl, pH 6,8	62,5 mM
Glycerol	25 % (v/v)
SDS	4% (w/v)
Bromphenol Blau	0,01% (v/v)

TG-Laufpuffer:

Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)

Renaturierungs-Puffer:

Triton X-100	2,5% (v/v)
--------------	------------

Entwicklungspuffer:

Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	200 mM
CaCl ₂	5 mM
Brij-35	0,02% (v/v)

Färbelösung:

Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10%(v/v)
Coomassie R250	0,5% (w/v)

Entfärbelösung:

Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10%(v/v)

4.3.7.3. Abbau von MaIS durch DegP und DegP-Derivate

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von DegP und DegP-Derivaten wurde 1 µM DegP mit 1,25 µM MaIS inkubiert. Bei Bedarf wurden aktivierende oder inhibierende Substanzen dazu gegeben und mit DegP vorinkubiert. Der Ansatz wurde 20 min bei entsprechender Temperatur inkubiert. Im Abstand von 2,5 min wurden Proben entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (4.2.3.2.).

4.3.8. Komplementation der Hitzesensitivität eines *degP*-Stammes durch *DegP* und *DegP*-Derivate

degP-Stämme sind hitzesensitiv und können bei Temperaturen oberhalb von 37°C nur noch schlecht und oberhalb von 42°C nicht mehr wachsen, da die Zellen lysieren. Um einen Hinweis auf die *in vivo* Funktion von DegP zu erhalten, wurde untersucht, ob durch DegP oder DegP-Derivate der temperatursensitive Phänotyp komplementiert werden kann. Hierfür wurde der *E.coli* Stamm KU98 mit dem jeweiligen Plasmid, das *degP* bzw. *degP*-Derivate exprimiert, über Nacht angezogen und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Hiervon wurden 1:10 Verdünnungen bis 10⁻⁷ angelegt und je 2 µl der entsprechenden Verdünnung auf NZA-Agarplatten mit IPTG in einer Konzentration von 1 µM aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 43°C.

4.3.9. Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC)

Zur Bestimmung thermodynamischer Charakteristika der Bindung zwischen DegP und verschiedenen Peptiden wurde die Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) durchgeführt. Bei der ITC wurde der Ligand kontinuierlich dem Protein hinzutitriert und die Wärmeentwicklung gemessen. Anhand dieser Größe können Enthalpie, Entropie und Dissoziationskonstante einer Bindung bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde ein VP-ITC Microkalorimeter der Firma MicroCal verwendet. Das Makromolekül (20 bis 40 µM) und das jeweilige Peptid (1 bis 1,5 mM) wurden für die Messungen im identischen Puffer gelöst und für 15 min entgast (Thermovac sample degasser, Microcal). Es wurden 1,4 ml Protein- und 0,3 ml Peptidlösung eingesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 37°C. Jeweils 5 µl Peptid wurden in 7,1 sec zu dem Protein titriert, wobei eine Äquilibrationszeit von 240 sec und eine Rührgeschwindigkeit von 394 rpm gewählt wurde. Zur Herstellung einer Referenzkurve wurde die Peptidlösung zu dem Puffer ohne Protein titriert. Die Daten wurden anschließend mit der Origin Software ausgewertet und gegen die Wärmeentwicklung der Referenzkurve korrigiert.

5. Ergebnisse

5.1. Entwicklung einer neuen Reinigung von DegP

5.1.1. Reinigung von DegP aus KU98/pCS20

DegP wurde nach dem Protokoll von Spiess *et al.* (Spiess *et al.* 1999) aus dem Stamm KU98, der das Plasmid pCS20 trägt, welches für *degP* Wildtyp kodiert, gereinigt. Die Induktion durch IPTG und die Reinheit des isolierten Proteins ist in Abb. 5.1. dargestellt. Das Protein zeigt in einem SDS-Gel eine elektrophoretische Auftrennung, welche seinem theoretischen Molekulargewicht von etwa 48 kDa entspricht. DegP ist autoproteolytisch aktiv (Lipinska *et al.*, 1990), wobei sich die zwei Hauptspaltstellen nach dem Cystein 69 und Glutamin 82 des reifen Proteins befinden (Skórko-Glonek *et al.*, 1995). Die Produkte der Proteolyse haben ein Molekulargewicht von 41 bzw. 40 kDa. Zusätzlich konnte eine Bande auf dem SDS-Gel detektiert werden, die einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa entspricht. Hierbei handelt es sich um eine Verunreinigung.

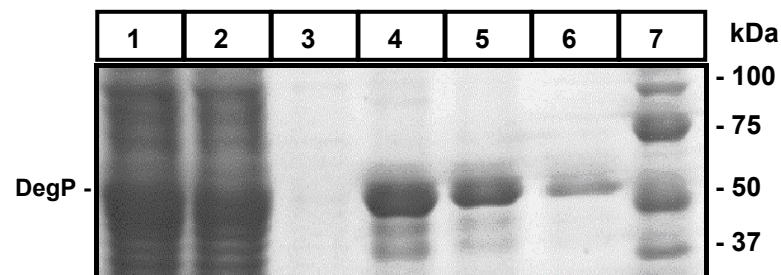


Abb. 5.1. SDS-PAGE der Überexpression und Reinigung des Proteins DegP

Für die Reinigung von DegP wurde der Stamm KU98/pCS20 bei 28°C angezogen. Die Expression von *degP* erfolgte nach der Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 10 µM über Nacht. Die Lyse der Zellen wurde mittels Mikrofluidizer und die daran anschließende Reinigung von DegP mittels Ni-NTA Superflow Säule durchgeführt. Die Analyse erfolgte auf einem 12%igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Anfärbung durch Coomassie-Blau. 1.) Ganzzelextrakt von KU98/pCS20, induziert mit 10 µM IPTG; 2.) Durchfluss der nicht gebundenen Proteine; 3.) Waschschrift mit Lysepuffer; 4.) DegP nach der Ni-NTA-Säule, erster Elutionsschritt; 5.) DegP nach der Ni-NTA-Säule, zweiter Elutionsschritt; 6.) DegP nach der Ni-NTA-Säule, dritter Elutionsschritt; 7.) Proteinmarker

Sklar *et al.* (Sklar *et al.* 2007) postuliert, dass DegP neben den beiden weiteren periplasmatischen Chaperonen Skp und SurA an der Assemblierung des Außenmembranproteins OmpC beteiligt ist. Zur Kontrolle, ob nach der Reinigung über die Ni-NTA Superflow Säule OmpC an DegP gebunden vorliegen könnte, wurde ein Western Blot der gereinigten Proteinprobe gegen OmpC-Antikörper durchgeführt (Abb. 5.2.).

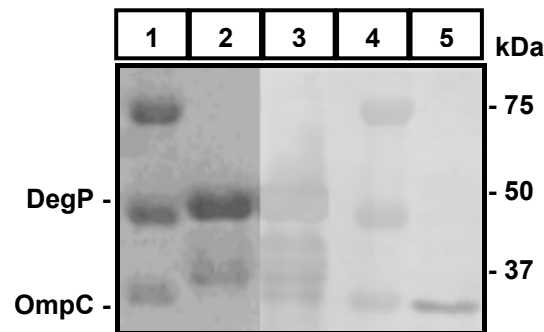


Abb. 5.2. SDS-PAGE und Western Blot gegen DegP- und OmpC-Antikörper des gereinigten DegPs

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 12%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Blau Färbung bzw. Immunodetektion mittels DegP- und OmpC-Antikörper. 1.) Proteinmarker, Coomassie gefärbt; 2.) gereinigtes DegP, Coomassie gefärbt; 3.) gereinigtes DegP immunodetektiert durch Anti-DegP-Antikörper; 4.) Proteinmarker; 5.) OmpC immunodetektiert durch Anti-OmpC-Antikörper

OmpC (38 kDa) konnte mittels Western Blot nach der DegP Reinigung detektiert werden. Ein zusätzlicher Waschschriff während der DegP Reinigung in Form von Lysepuffer mit 1 M NaCl, welches eine mögliche unspezifische Bindung zwischen DegP und OmpC auflösen sollte, führte nicht zu einer Abtrennung des OmpCs. Auch eine Inkubation von 1 h bei 37°C führte nicht zu einem Abbau des OmpCs durch DegP. Da unter anderem auch eine Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) von DegP mit anderen Proteinen durchgeführt werden sollte, musste das Expressionssystem für DegP geändert werden.

5.1.2. Herstellung eines OmpC Stammes durch P1-Transduktion

Die P1-Transduktion verlief nach der Beschreibung von Silhavy *et al.* (Silhavy *et al.*, 1984). Als Donorstamm diente JWK2203 (*ompC::kan*), als Akzeptorstamm der Stamm CLC198 (*degP::tet*). Der hieraus resultierende Stamm MA001 wurde als

neuer Expressionsstamm getestet und das gereinigte DegP auf mögliche Verunreinigungen durch OmpC mittels Western Blot untersucht (Abb. 5.3.). Es konnte kein OmpC nachgewiesen werden.

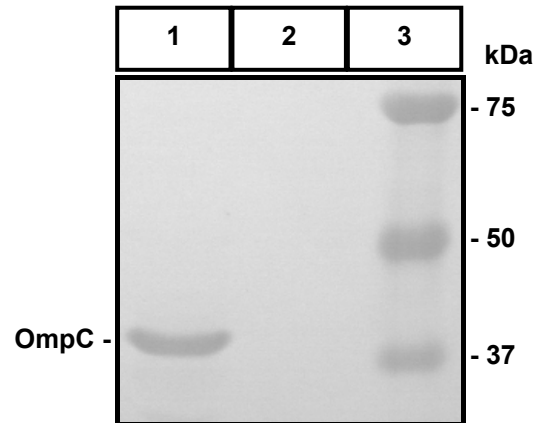


Abb. 5.3. Western Blot des gereinigten DegP gegen OmpC-Antikörper

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 12%igen SDS-Gel mit anschließender Immunodetektion mittels OmpC-Antikörper 1.) gereinigtes DegP aus KU98/pCS20; 2.) gereinigtes DegP aus MA001/pCS20 3.) Proteinmarker

5.1.3. Modifizierung des Reinigungsprotokolls über Ni-NTA

Das neue Expressionssystem aus MA001 für die DegP Reinigung führte insbesondere bei DegP Punktmutanten, welche ein relativ niedriges Expressionslevel zeigten, zu einem niedrigen Reinheitsgrad. Zur Optimierung der Reinigung wurde dem Protokoll des Säulenmaterialherstellers, welches einen Waschschrift mit Lysepuffer und darauffolgend die Elution mit 150 mM Imidazol vorsah, ein Gradient mit Imidazol von 0 bis 150 mM hinzugefügt. Hierdurch konnte ein Reinheitsgrad der Proteinprobe von >95% erreicht werden (Abb. 5.4.a).

5.2. Reinigung von DegP und DegP-Derivaten

5.2.1. Reinigung von DegP, DegP_{S210A}, DegP_{N45F,S210A}, DegP_{N45F,Q47F,S210A} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A}

Für das Protein DegP und seine durch Austausch des Serins 210 im aktiven Zentrum proteolytisch inaktive Punktmutante, sowie für die ebenfalls proteolytisch inaktiven Punktmutanten DegP_{N45F,S210A}, DegP_{N45F,Q48F,S210A} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} konnte die neu etablierte Reinigung durchgeführt werden. Die Ausbeuten lagen zwischen 5 und 10 mg pro Liter Flüssigkultur. Menge und Reinheit waren bei allen fünf Proteinen vergleichbar. Der proteolytisch aktive Wildtyp zeigte im Vergleich zu den inaktiven Mutanten eine etwa 5-10%ige Autoproteolyse (Abb. 5.4.a und Abb. 5.4.b)

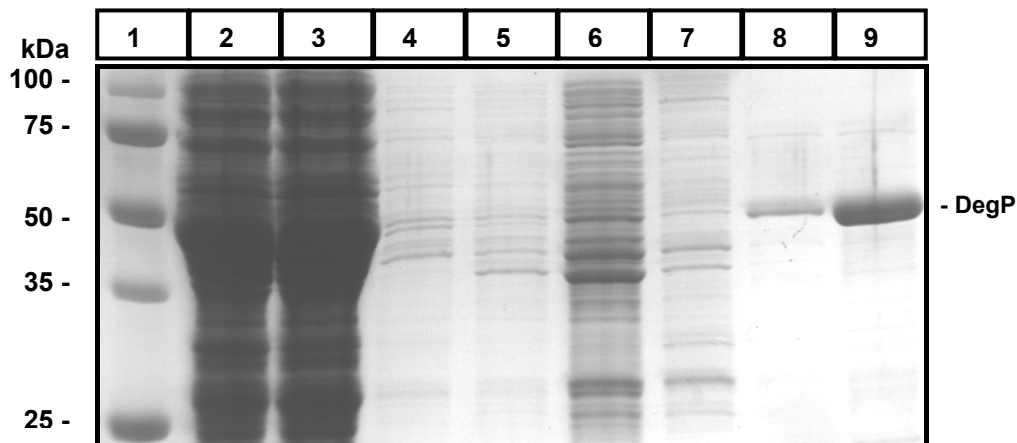


Abb. 5.4.a SDS-Gel der neuen Überexpression und Reinigung des Proteins DegP_{S210A}

Die Expression und Lyse der Zellen erfolgte nach Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999). Die anschließende Reinigung von DegP_{S210A} durch eine Ni-NTA Superflow Säule erfolgte mittels eines zusätzlichen Elutionsgradienten mit Imidazol von 0 bis 150 mM. Der Nachweis erfolgte auf einem 12%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Blau Färbung. 1.) Proteinmarker 2.) Ganzzellextrakt von MA001/pCS21, induziert mit 10 μM IPTG; 3.) Durchfluss der nicht gebundenen Proteine; 4.) erster Waschschrift mit Lysepuffer; 5.) zweiter Waschschrift mit Lysepuffer; 6.) Elution mit 25 mM Imidazol; 7.) Elution mit 50 mM Imidazol; 8.) Elution mit 100 mM Imidazol; 9.) Elution mit 150 mM Imidazol

5.2.2. Reinigung von DegP_{N45F}, DegP_{N45F,Q48F} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F}

Die DegP-Derivate DegP_{N45F}, DegP_{N45F,Q48F} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F} zeigten bei der Reinigung eine erhöhte Autoproteolyse. Konnte DegP Wildtyp mit einer Autoproteolyserate von weniger als 10% gereinigt werden, so lag der Eigenabbau der DegP-Derivate bei bis zu 50%. Infolgedessen wurden Induktionstests bei unterschiedlicher Temperatur, IPTG Konzentration und Induktionsdauer durchgeführt. Dabei zeigte eine Induktion bei 1 mM für 1 h bei 28°C das beste Ergebnis. Durch diese verbesserte Induktion konnte die Autoproteolyse der Proteine auf etwa 15-20% reduziert werden, so dass diese auch für weitere Versuche genutzt werden konnten (Abb. 5.4.b).

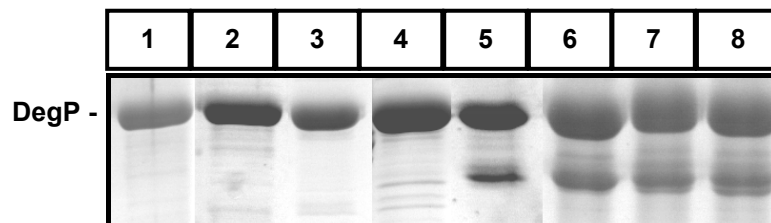


Abb. 5.4.b Vergleich von DegP und DegP-Derivaten nach der neuen Überexpression und Reinigung

Die Expression und Lyse der Zellen für DegP, DegP_{S210A}, DegP_{N45F,S210A}, DegP_{N45F,Q48F,S210A} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} erfolgte nach Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999). Die Expression der DegP-Derivate DegP_{N45F}, DegP_{N45F,Q48F} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F} erfolgte mit 1 mM IPTG für 1 h bei 28°C. Die anschließende Reinigung aller Proteine durch eine Ni-NTA Superflow Säule erfolgte mit einem zusätzlichen Elutionsgradienten mit Imidazol von 0 bis 150 mM. Der Nachweis erfolgte auf einem 12%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Blau Färbung. 1.) DegP_{S210A}; 2.) DegP_{N45F,S210A}; 3.) DegP_{N45F,Q48F,S210A}; 4.) DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A}; 5.) DegP; 6.) DegP_{N45F}; 7.) DegP_{N45F,Q48F}; 8.) DegP_{N45F,Q47F,Q48F}

5.3. Reinigung des Außenmembranproteins OmpC

Für spätere Versuchsreihen wurde das Außenmembranprotein OmpC gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach Arockiasamy und Krishnaswamy (Arockiasamy und Krishnaswamy, 2000) aus dem wildtypischen Stamm MC4100 mit dem Plasmid pTrcOmpC. Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung durch drei Inkubationsschritte in Pufferlösungen, die einen SDS-Stufengradienten darstellten, und anschließender Zentrifugation bei jeweils 25.000 g. In den ersten beiden

Reinigungsschritten konnte OmpC im Pellet detektiert werden. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt lag OmpC im löslichen Überstand vor (Abb. 5.5.). Der letzte Reinigungsschritt wurde mindestens zweimal wiederholt und die Probe am Ende aufkonzentriert. Es konnte eine Reinheit von > 98% erreicht werden.

Da OmpC nach der Reinigung als Trimer vorlag, es für die nachfolgenden Versuche jedoch als ungefaltetes Monomer benötigt wurde, wurde es in 8 M Harnstoff aufgenommen und bei 90°C für 2 min denaturiert. Die vollständige Denaturierung wurde auf einem nativen Proteingel kontrolliert.

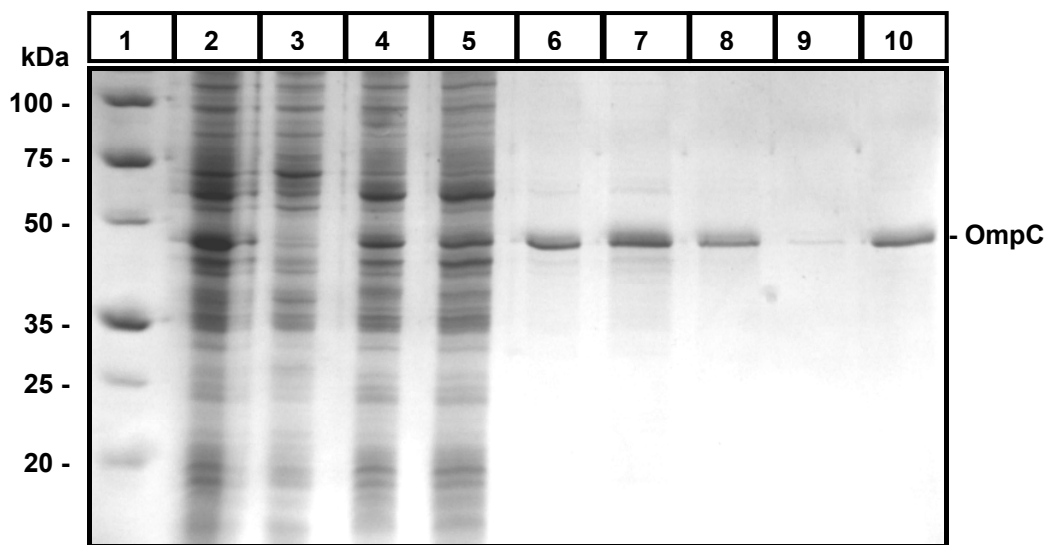


Abb. 5.5. OmpC Reinigung aus MC4100/pTrcOmpC

Die Reinigung erfolgte nach Arockiasamy und Krishnaswamy (Arockiasamy und Krishnaswamy, 2000). Der Nachweis erfolgte auf einem 12%igen SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Blau Färbung. 1.) Proteinmarker 2.) Ganzzelextrakt von MC4100/pTrcOmpC, induziert mit 1 mM IPTG für 3 h; 3.) Überstand nach 1. Zentrifugationsschritt; 4.) Pellet nach 1. Zentrifugationsschritt; 5.) Überstand 2. Zentrifugationsschritt; 6.) Pellet 2. Zentrifugationsschritt; 7.) Überstand 3. Zentrifugationsschritt; 8.) Pellet 3. Zentrifugationsschritt; 9.) Überstand der Wiederholung des 3. Waschschritts mit anschließender Zentrifugation; 10.) gereinigtes OmpC nach Konzentrierung mit Vivaspinn 15R, 10 kDa

5.4. Entwicklung und Etablierung eines quantifizierbaren Enzymassays

5.4.1. Entwicklung eines synthetischen DegP Substrats

Um einen quantifizierbaren Enzymassay für DegP zu entwickeln, sollte ein synthetisches Oligopeptid mit einer p-Nitroanilin Gruppe (pNA) an die Position P₁ gekoppelt werden. Die aus der Proteolyse resultierende Abspaltung des pNAs führt zu einem Absorptionsanstieg bei 405 nm, welcher quantifiziert werden kann. Zur Ableitung der Sequenz des synthetischen Oligopeptids wurden Kompletต์verdaus von Citratsynthase (EC 2.3.3.1) und Malatdehydrogenase des Schweins (EC 1.1.1.37) durch DegP durchgeführt und per Maldi-TOF ausgewertet¹. Die etwa 150 pro Protein bestimmten Fragmente wurden in die jeweilige Primersequenz der Ausgangsproteine alignment. Da zum Teil Fragmente mit der gleichen P₁, jedoch unterschiedlich langer Sequenz auftraten, wurden jeweils nur die kürzesten Fragmente ausgewählt.

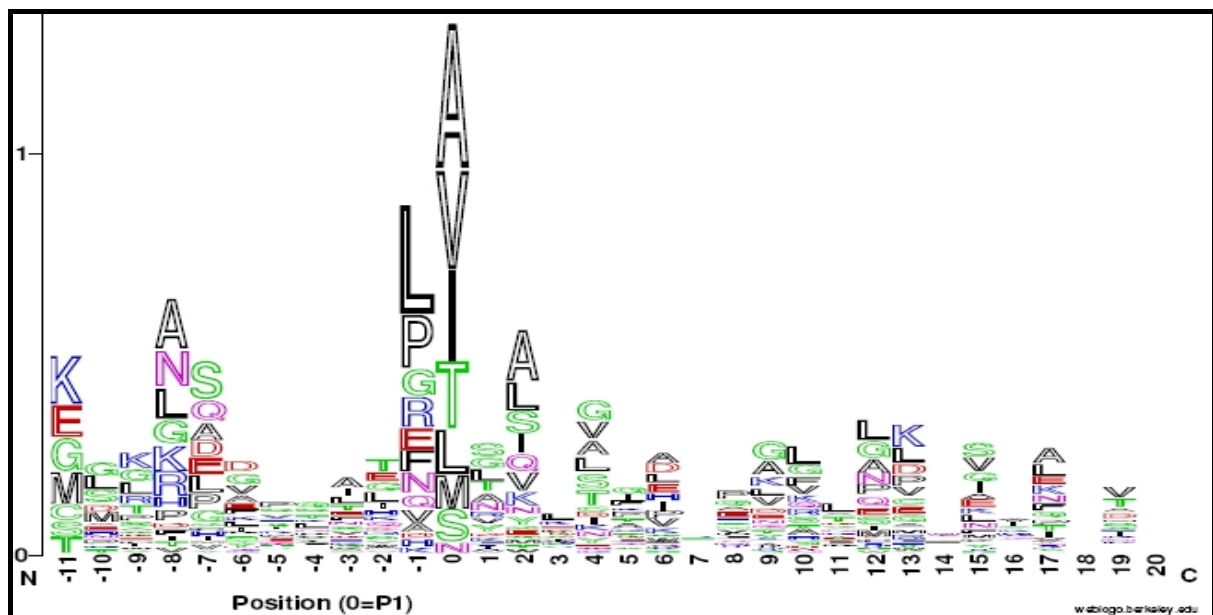


Abb. 5.6. Profil der Kompletต์verdaus von Citratsynthase und Malatdehydrogenase durch DegP (www.weblogo.berkeley.edu)

Die Aminosäuresequenz der Fragmente wurde von der N-terminalen Aminosäure P₁₂ (Position -11) bis zur C-terminalen Aminosäure P₁₉ (Position 19) aufgetragen. Die Aminosäure P₁ ist im Profil mit Position 0 benannt.

¹ Die Kompletต์verdaus und Maldi-TOF-Analysen wurden in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Pathologie (IMP) in Wien durchgeführt.

Aus diesen etwa 100 Fragmenten wurde mit Hilfe des Programms „weblogo“ (www.weblogo.berkeley.edu) ein Profil des DegP Verdaus angelegt (Abb. 5.6.).

Das Profil zeigt eine erhöhte Häufigkeit der Aminosäuren Valin, Alanin und Isoleucin für die Schnittstelle, die sogenannte P₁ Position. Hierbei handelt es sich um hydrophobe Aminosäuren, für die DegP eine Spezifität an dieser Position zu haben scheint. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Resultat von Kolmar *et al.* (Kolmar *et al.*, 1996), welches eine Spezifität von DegP für Valin in der P₁ Position postuliert. Abgeleitet aus dem Profil wurden diejenigen Produkte der Komplettverdaus ausgewählt, die diese Voraussetzung erfüllten. Von acht dieser Produkte wurden Oligopeptide synthetisiert und mit einem pNA gekoppelt¹. Die pNA Peptide wurden in einen Enzymassay mit DegP eingesetzt und die spezifische Aktivität für die jeweiligen Substrate bestimmt (Abb. 5.7.). Das pNA Peptid SPMFKGV-pNA, abgeleitet von einem Produkt des Verdaus der Citratsynthase mit DegP, ergab als einziges eine zu quantifizierende spezifische Enzymaktivität. Dieses Substrat wurde für die weiteren Versuche benutzt.

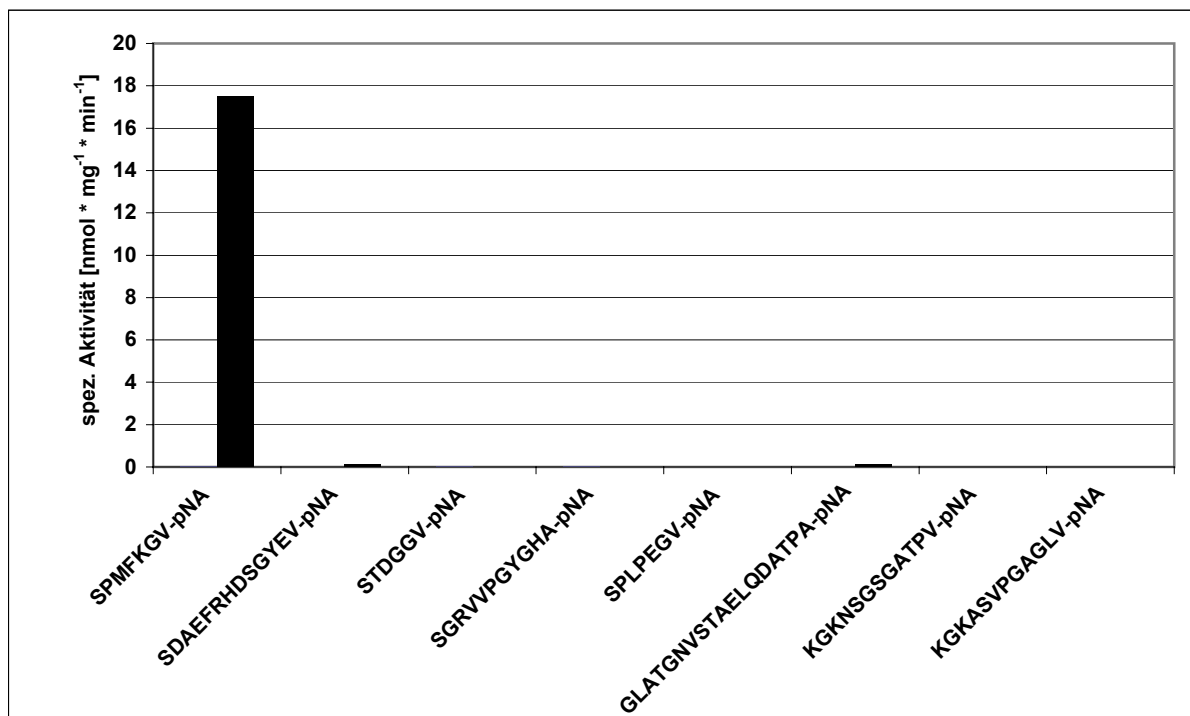


Abb. 5.7. Bestimmung der spezifischen Aktivität für unterschiedliche pNA Peptide

Die Peptide wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt und mit 1 µM Protein vermischt. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer (100 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl; pH 8,0) auf 100 µl aufgefüllt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm kontinuierlich bei 37°C für 1 h gemessen. Den spezifischen Aktivitäten liegen dreifache Doppelbestimmungen mit einer Standardabweichung von < 10% zugrunde.

¹ Die pNA Substratsynthese erfolgte in Kooperation mit dem Chemical-Genomics-Centre (CGC) in Dortmund.

5.4.2. Bestimmung der optimalen Bedingungen für den spezifischen Enzymassay

5.4.2.1. pH-Toleranz von DegP

Die pH-Toleranz von DegP wurde durch Enzymtests mit dem entwickelten Substrat SPMFKGV-pNA bestimmt. Hierfür wurde ein Bereich von pH 4 bis 11 mit jeweils mindestens zwei Puffersubstanzen für einen pH-Wert untersucht. Die Puffersubstanzen wurden jeweils in einer Konzentration von 100 mM angesetzt und die Ionenstärke der Lösung mit NaCl auf 150 mM eingestellt. Die Berechnung der benötigten Stoffmengen beruht auf dem im Internet frei verfügbaren Pufferkalkulator der Universität Liverpool (www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html). Das Ergebnis der Aktivitätstests ist in Abb. 5.8. dargestellt.

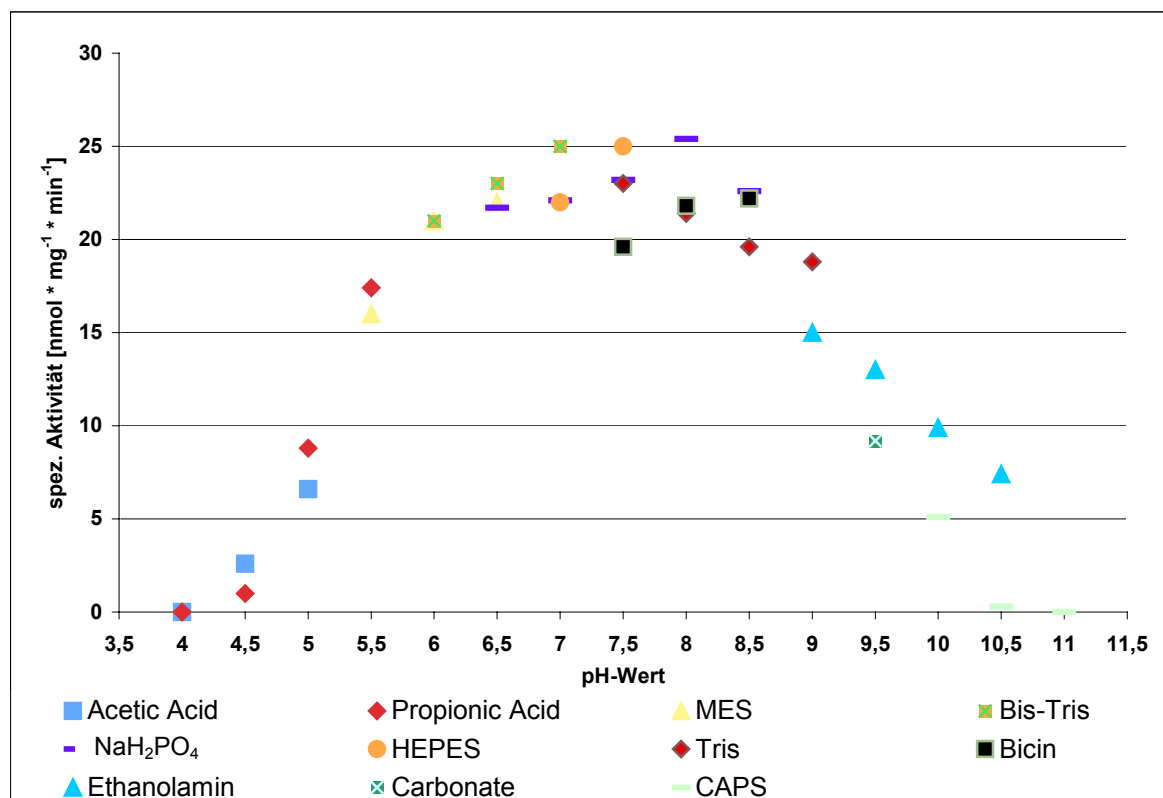


Abb. 5.8. pH-Toleranz von DegP

Das SPMFKGV-pNA wurde in einer Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt und mit 1 μ M Protein vermischt. Der Ansatz wurde mit dem jeweiligen Reaktionspuffer (100 mM Puffersubstanz; Ionenstärke 150 mM ad. NaCl) auf 100 μ l aufgefüllt. Die Veränderung in der A_{405} wurde für 1 h bei 37°C bestimmt und quantifiziert. Die Standardabweichung lag unter 15%.

Die pH-Toleranz von DegP ergab eine gaußsche Normalverteilung. DegP zeigte eine hohe pH-Toleranz, da eine spezifische Enzymaktivität von pH 4,5 bis 10,5 nachgewiesen werden konnte. Im pH-Bereich von 6 bis 9 konnte eine spezifische Aktivität von etwa 15 bis 25 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bestimmt werden. Da im Bereich von pH 8 das Optimum ermittelt werden konnte und dies physiologischen Bedingungen entspricht, wurde der NaH_2PO_4 Puffer pH 8 für die weiteren Versuche genutzt.

5.4.2.2. Einfluss der Ionenstärke auf die Enzymaktivität

Der Einfluss der Ionenstärke auf die *in vitro* Enzymaktivität von DegP wurde durch eine Konzentrationsreihe mit NaCl untersucht. Insgesamt wurde ein Bereich von 144 bis 900 mM Ionenstärke analysiert (Abb. 5.9.). DegP zeigte eine relativ hohe Ionenstärketoleranz. Erst bei einer 6fach höheren Ionenstärke konnte eine Halbierung der spezifischen Aktivität gezeigt werden. Da kein positiver Effekt durch höhere Ionenstärken nachgewiesen werden konnte, wurde die Ionenstärke in den folgenden Versuchen im Puffer reduziert. Als Reaktionspuffer für die weiteren Versuche wurde 50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0 benutzt.

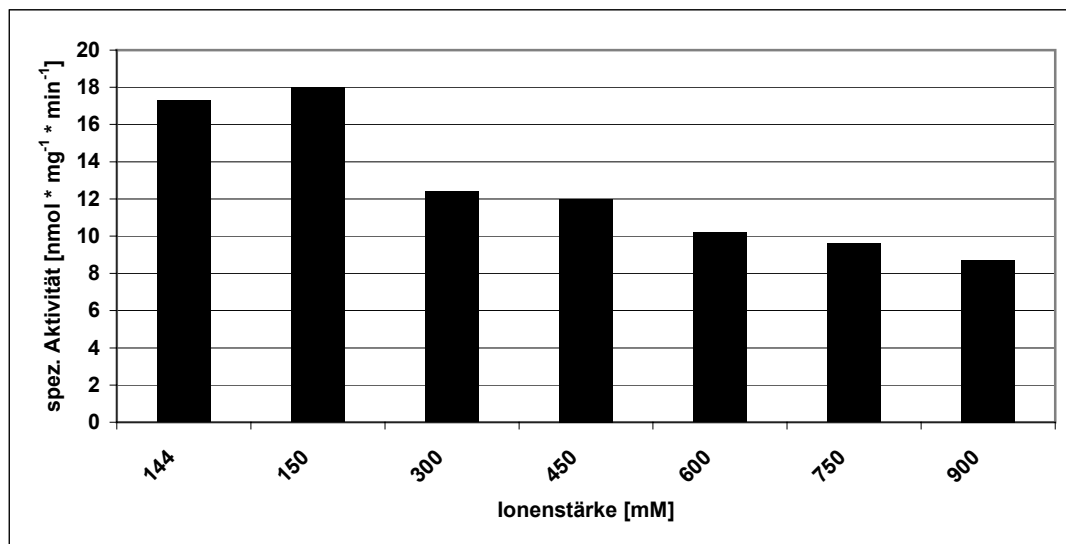


Abb. 5.9. Einfluss der Ionenstärke auf die Enzymaktivität von DegP

Die Pufferlösung (100 mM NaH_2PO_4 , pH 8) wurde mit NaCl auf die jeweilige Ionenstärke eingestellt (144 bis 900 mM). 0,5 mM pNA Peptid wurde mit 1 μM Protein inkubiert, der Anstieg in A_{405} für 1 h bei 37°C kontinuierlich gemessen und die spezifische Aktivität bestimmt (Standardabweichung < 15%).

5.4.2.3. Einfluss von bivalenten Kationen

Um die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von DegP von bivalenten Kationen zu untersuchen, wurden zweiwertige Kationen durch Zugabe des Chelators EDTA (10 mM) entfernt. Im weiteren wurden bivalente Kationen in Form von MgCl_2 bzw. CaCl_2 (10 mM) zu dem Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wurde jeweils die DegP Aktivität bestimmt. Die Auswertung der Aktivitätstests ergab, dass DegP weder durch den Entzug noch die Zugabe von zweiwertigen Kationen beeinflusst wurde.

5.4.2.4. Einfluss von Reduktionsmitteln

Der Einfluss von Reduktionsmitteln auf die Enzymaktivität von DegP sollte durch die Zugabe von DTT und β -Mercaptoethanol in pNA Aktivitätstests untersucht werden. Dabei konnte für DegP eine hohe Toleranz gegenüber den Reduktionsmitteln gezeigt werden (Tab. 5.1.). Selbst bei 1.000fachem (1 mM) bzw. 100.000fachem (100 mM) Überschuss an DTT bzw. β -Mercaptoethanol im Vergleich zum eingesetzten DegP (1 μM) konnte keine signifikante Reduzierung der spezifischen Aktivität im pNA Aktivitätstest nachgewiesen werden.

Tab. 5.1. Einfluss von Reduktionsmitteln auf die spezifische Aktivität von DegP

Der Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) wurde mit steigenden Konzentrationen von Reduktionsmitteln versetzt. Der Enzymassay wurde mit 0,5 mM pNA Peptid und 1 μM DegP bei 37°C durchgeführt und analysiert. Die Standardabweichung betrug < 12%.

	DTT [mM]				β -Mercaptoethanol [mM]		
	1	0,1	0,01	0	100	10	1
Spezifische Aktivität [nmol * mg^{-1} * min^{-1}]	15,3	16,2	15,8	16,8	14,1	15,7	16,1

5.4.2.5. Einfluss von Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde als Lösungsmittel für die synthetischen Peptide benutzt. Für spätere Versuche wurde die Toleranz von DegP gegenüber dem

Lösungsmittel im Enzymassay getestet. Die standardmäßig eingesetzte Endkonzentration an DMSO in pNA Aktivitätstests betrug 1%. Ab einer Endkonzentration von 5% konnte eine Aktivitätsabnahme von etwa 10 bis 20% bestimmt werden. Eine Endkonzentration von über 10% führte zu einer mehr als 50%igen Reduzierung der spezifischen Aktivität.

5.5. Optimierung des pNA Substrates durch Austausch einzelner Aminosäuren

5.5.1. Bestimmung der kinetischen Konstanten für das Substrat SPMFKGV-pNA

Für das durch Kompletต์verdauanalyse ermittelte Substrat SPMFKGV-pNA sollten die kinetischen Eigenschaften in Form von Bindekonstante, maximale Reaktionsgeschwindigkeit und Geschwindigkeitskonstante ermittelt werden. Hierdurch kann zum einen die Spezifität des Substrates genauer bestimmt werden und zum anderen können möglicherweise weitere Rückschlüsse im Hinblick auf den Mechanismus des Substratumsatzes gezogen werden. Dafür wurde ein Konzentrationsbereich für das Substrat gewählt, in dem die spezifische Aktivität von DegP noch minimal quantifizierbar ist bzw. im oberen Konzentrationsbereich bereits in der Sättigung vorliegt. Der Konzentrationsbereich von 0,05 bis 10 mM erwies sich hierfür als geeignet. Die Aktivitäten [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$] wurden gegen die Substratkonzentration [mM] graphisch aufgetragen (Abb. 5.10.).

Die graphische Auftragung der bestimmten Aktivitäten gegen die Substratkonzentration zeigte einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Dies weist auf eine kooperative Bindung des Substrates an DegP hin. Deshalb wurden die Daten nicht nach der Michaelis-Menten-Methode ausgewertet, sondern mittels Hill-Gleichung, welche speziell für die Auswertung kooperativer Bindungen verwendet wird. Zur Berechnung der Daten wurde das Auswertungsprogramm „GraphPad Prism4“ genutzt (Tab. 5.2.).

Im Vergleich zu anderen Serinproteasen wie z.B. Trypsin, welches in einem vergleichbaren Enzymassay mit dem Substrat Bz-R-pNA eine Bindekonstante von 0,4 mM und eine Geschwindigkeitskonstante von $1,1 \text{ sec}^{-1}$ aufweist (Asgeirsson und Cekan, 2006), ist das entwickelte spezifische Substrat für DegP mit einem EC_{50} von 2,6 mM und einem k_{cat} von $0,56 \text{ s}^{-1}$ etwas schlechter. Daher stellte sich die Frage, ob das Substrat möglicherweise durch Aminosäureaustausch verbessert werden kann, oder ob DegP einen insgesamt schlechteren proteolytischen Umsatz aufweist.

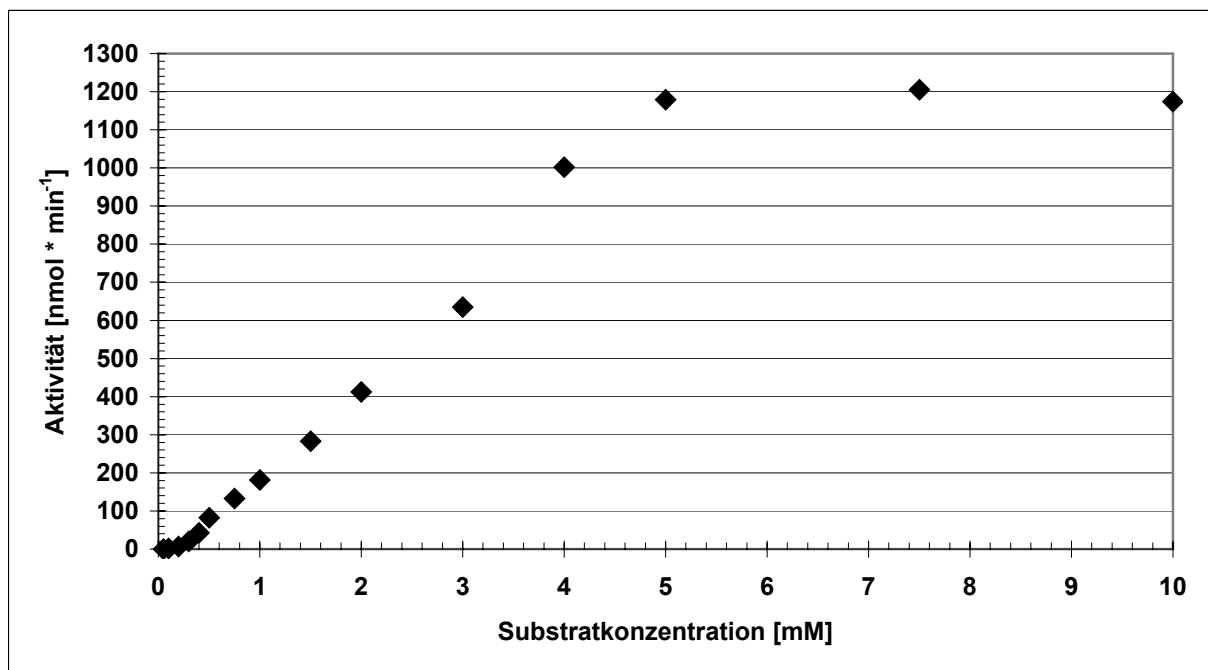


Abb. 5.10. Bestimmung der kinetischen Daten für das Substrat SPMFKGV-pNA

1 μM DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8) mit steigenden Konzentrationen (0,05 bis 10 mM) des Substrates inkubiert und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden gegen die eingesetzte Substratmenge aufgetragen (Standardabweichung < 20%).

Tab. 5.2. Ermittelte kinetische Daten für das Substrat SPMFKGV-pNA

Konstante	SPMFKGV-pNA
Bindekonstante für kooperative Bindung (EC_{50})	2,6 mM
Max. Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max})	1280 [nmol*min ⁻¹]
Geschwindigkeitskonstante (k_{cat})	0,5 sec ⁻¹
Kooperativitätsfaktor (Hillslope)	2,6

5.5.2. Veränderung der spezifischen Aktivität und kinetischen Daten durch Aminosäureaustausch beim pNA Substrat

Zur Optimierung des pNA Peptids als Substrat für DegP wurde erneut das Profil der Komplettverdaus von Citratsynthase und Malatdehydrogenase analysiert. Im Bereich von P₁ bis P₇ konnten neben der bereits thematisierten Präferenz für Valin auf P₁ eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Position P₂ für Leucin oder Prolin (beides unpolare Aminosäuren) ermittelt werden. Die Positionen P₃ bis P₆ zeigten keine Auffälligkeiten. Auf P₇ fiel jedoch die Aminosäure Asparaginsäure mit der relativ höchsten Häufigkeit für diese Position auf, da sie im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren an P₇ eine polare Aminosäure ist.

Infolgedessen wurde in Kooperation mit dem Chemical-Genomics-Centre (CGC) am Max-Planck-Institut in Dortmund ein neues pNA Substrat synthetisiert, welches an den Positionen P₂ und P₇ verändert war. Im Vergleich zum ersten pNA Peptid mit der Sequenz SPMFKGV-pNA wurde die neue Sequenz DPMFKLV-pNA synthetisiert.

Dieses neue Peptid wurde als Substrat für DegP im Enzymassay unter den entwickelten Standardbedingungen getestet. Die hierbei bestimmte spezifische Aktivität lag bei $443 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, also etwa 25 mal höher als bei dem Substrat SPMFKGV-pNA. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivität konnte die einzusetzende Proteinkonzentration auf $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ reduziert werden.

Wie unter 5.5.1. *Bestimmung der kinetischen Daten für das Substrat SPMFKGV-pNA* wurde eine Konzentrationsreihe für das neue Substrat mit DegP bestimmt. Insgesamt wurde ein Konzentrationsbereich von $0,05 \text{ mM}$ bis 3 mM analysiert. Ab einem Bereich von etwa 1 mM Substrat konnte eine Absättigung nachgewiesen werden. Die kinetischen Konstanten für das Substrat DPMFKLV-pNA wurden erneut nach Hill unter zu Hilfenahme des Computerprogramms „GraphPad Prism4“ bestimmt (Tab. 5.3.).

Tab. 5.3. Ermittelte kinetische Daten für das Substrat DPMFKLV-pNA

Konstante	DPMFKLV-pNA
Bindekonstante für kooperative Bindung (EC_{50})	$0,6 \text{ mM}$
Max. Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max})	$8721 \text{ [nmol} \cdot \text{min}^{-1}]$
Geschwindigkeitskonstante (k_{cat})	$0,9 \text{ sec}^{-1}$
Kooperativitätsfaktor (Hillslope)	$5,1$

Mit dem neuen Substrat konnte im Vergleich zu dem Substrat SPMFKGV-pNA ein 4fach besserer EC_{50} und 6fach besserer V_{max} bestimmt werden. Die k_{cat} konnte um das 1,8fache erhöht werden. Durch den Aminosäureaustausch innerhalb der Sequenz des DegP pNA Substrates konnten somit vergleichbare kinetische Konstanten wie für Trypsin (Bindekonstante von 0,4 mM und k_{cat} von 1,1 sec^{-1}) bestimmt werden (Asgeirsson und Cekan, 2006).

Der Kooperativitätsfaktor ist ein Maß für die an einer Reaktion beteiligten Untereinheiten. D.h., liegt ein Faktor von 1 vor, so ist nur eine Untereinheit an der Reaktion beteiligt, bei einem Faktor von 2 zwei Untereinheiten beteiligt usw.. Der Kooperativitätsfaktor des DPMFKLV-pNAs lag mit 5,1 etwa doppelt so hoch wie der des SPMFKGV-pNAs mit 2,6. Hieraus kann die Hypothese erstellt werden, dass das SPMFKGV-pNA an drei Untereinheiten des Hexamers DegP kooperativ bindet. Das DPMFKLV-pNA hingegen scheint mit allen sechs Untereinheiten des Hexamers DegP kooperativ zu interagieren, was möglicherweise auch die Verbesserung der kinetischen Daten erklären könnte.

5.6. Inhibierung der proteolytischen Aktivität von DegP

5.6.1. Chloromethylketon- und Boronsäure-Derivate als Inhibitoren

Um einen Inhibitor für DegP zu entwickeln, wurde auf Grundlage des entwickelten SPMFKGV-pNA Substrates ein Chloromethylketon-Derivat (CMK) hergestellt. Im Weiteren wurden für das SPMFKGV- und DPMFKLV-pNA jeweils Boronsäure-Derivate hergestellt. Beide Derivattypen gehören zu der großen Gruppe der Serinproteaseinhibitoren, die stabile Addukte mit Ser₂₁₀ bilden, die dem tetraedrischen Übergangszustand in der Protease-Reaktion ähneln. Dabei unterscheiden sich die Derivattypen in ihren Bindungseigenschaften. Die peptidischen Boronsäure-Derivate formen zwar kovalente tetraedrische Addukte, die aber im Gleichgewicht mit dem freien Enzym und dem freien Inhibitor stehen, deren Inhibition somit reversibel ist. Die Inhibierung durch Bindung der Chloromethylketone mit den Addukten ist irreversibel. Die irreversible Bindung ist damit zu erklären, dass

bei den peptidischen Chloromethylketonen neben der Bildung der Addukte noch zusätzlich die Alkylierung des His₁₀₅ der katalytischen Triade erfolgt (Philipp und Bender, 1983).

Für eine mögliche Co-Kristallisierung von DegP mit einem Inhibitor sollte das inhibitorische Peptid SPMFKGV-CMK getestet werden. Hierfür wurde im ersten Schritt das SPMFKGV-CMK in äquimolaren Verhältnissen zum SPMFKGV-pNA in den Enzymassay gegeben, wobei eine 5 minütige Vorinkubation von DegP mit dem potentiellen Inhibitor stattfand. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte eine vollständige Inhibierung erreicht werden, so dass eine Testreihe mit sinkenden Inhibitorkonzentrationen durchgeführt wurde (Abb. 5.11.). Anhand dieser Resultate konnte die Konzentration bestimmt werden, bei der eine 50%ige Inhibierung (IC_{50}) vorlag. Der IC_{50} des inhibitorischen Peptids SPMFKGV-CMK wurde mit 75 μM bestimmt.

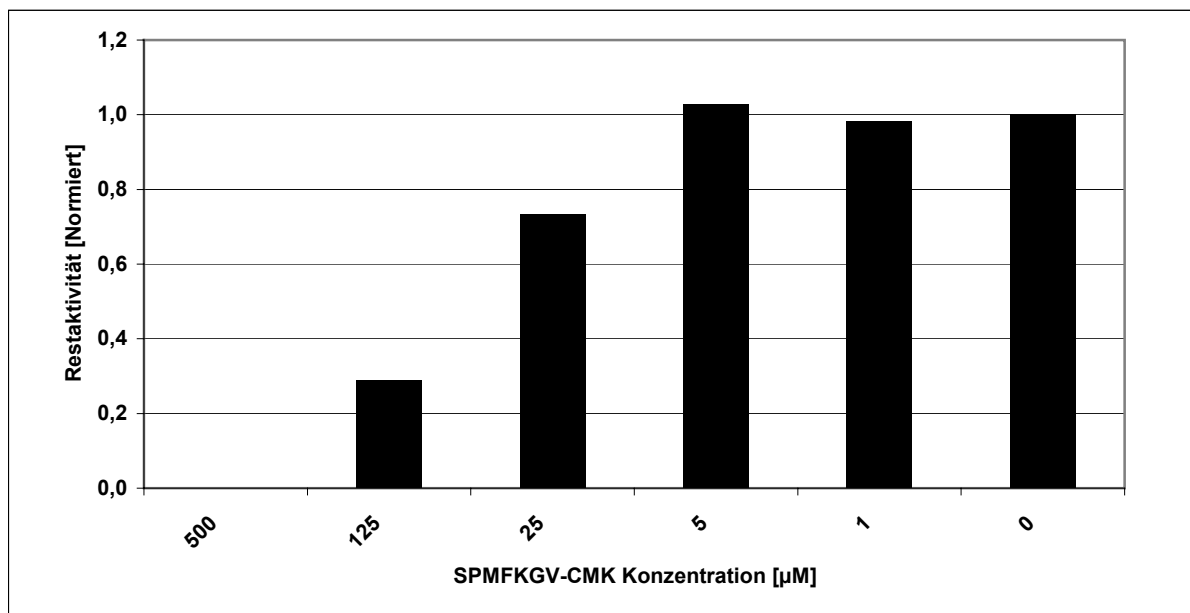


Abb. 5.11. Konzentrationsreihe des SPMFKGV-CMK Inhibitors

1 μM DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8) mit sinkenden Konzentrationen (500-0 μM) des SPMFKGV-CMKs vorinkubiert. 0,5 mM des SPMFKGV-pNA Substrates wurden zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert und gegen die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen aufgetragen (Standardabweichung < 10%).

Für Versuche, die eine reversible Inhibierung von DegP benötigten, wurden zusätzlich die Boronsäure-Derivate SPMFKGV-Boronsäure und DPMFKLV-Boronsäure synthetisiert. Beide wurden wie das CMK-Derivat erst in äquimolaren

Verhältnissen in den Enzymassay eingesetzt. Hierbei konnte jeweils eine vollständige Inhibierung detektiert werden. Somit konnten niedrigere Konzentrationen getestet werden, um die jeweiligen IC_{50} Werte zu bestimmen (Abb. 5.12.a und Abb. 5.12.b). Für die SPMFKGV-Boronsäure wurde dabei ein IC_{50} von 23 μM bestimmt. Die DPMFKLV-Boronsäure zeigte sich als bester Inhibitor mit einem IC_{50} von 0,28 μM .

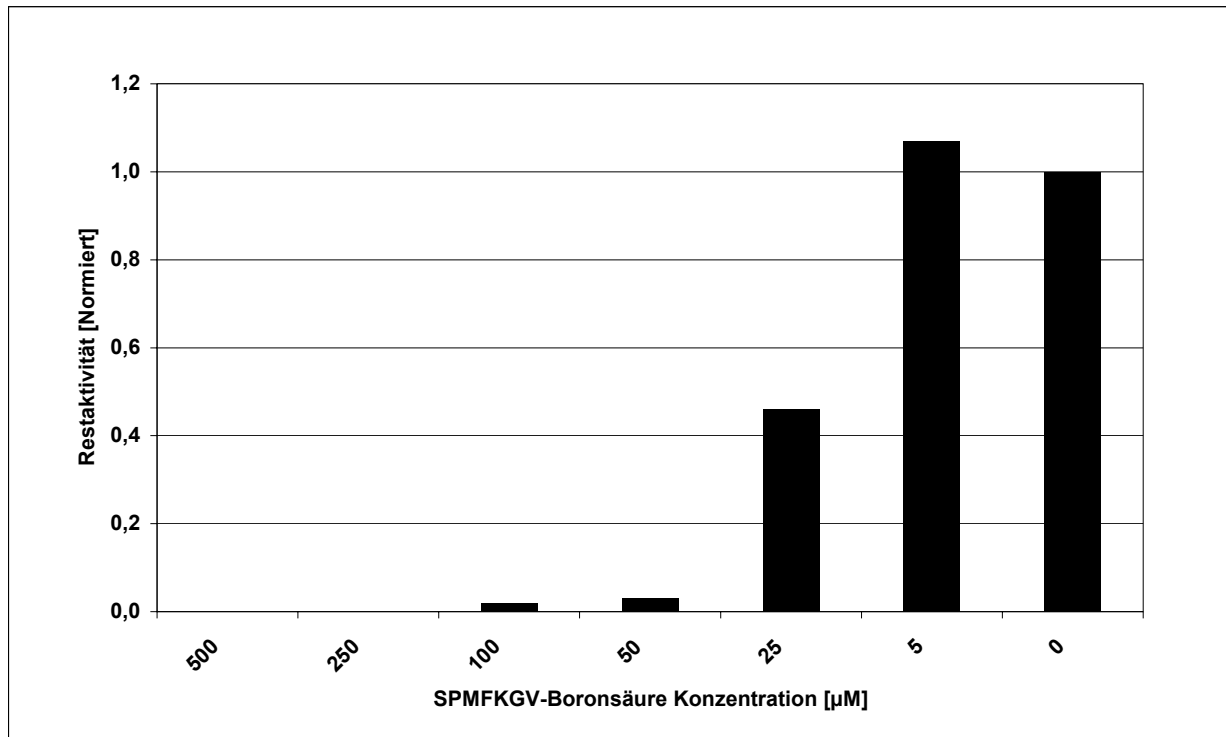


Abb. 5.12.a Konzentrationsreihe des SPMFKGV-Boronsäure Inhibitors

1 μM DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8) mit sinkenden Konzentrationen (0-500 μM) der SPMFKGV-Boronsäure vorinkubiert. 0,5 mM des SPMFKGV-pNA Substrates wurden zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert und gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen (Standardabweichung < 12%).

5.6.2. Test weiterer Chloromethylketon Peptide

Um auszuschließen, dass die beobachtete Inhibierung der Enzymaktivität aufgrund einer unspezifischen Inhibierung durch CMK Peptide bei DegP auftritt und um weitere putative Inhibitoren zu untersuchen, wurden wie bei der Entwicklung der pNA Substrate weitere fünf CMK Peptide aufgrund von Komplettverdauanalysen synthetisiert und getestet (Abb. 5.13.).

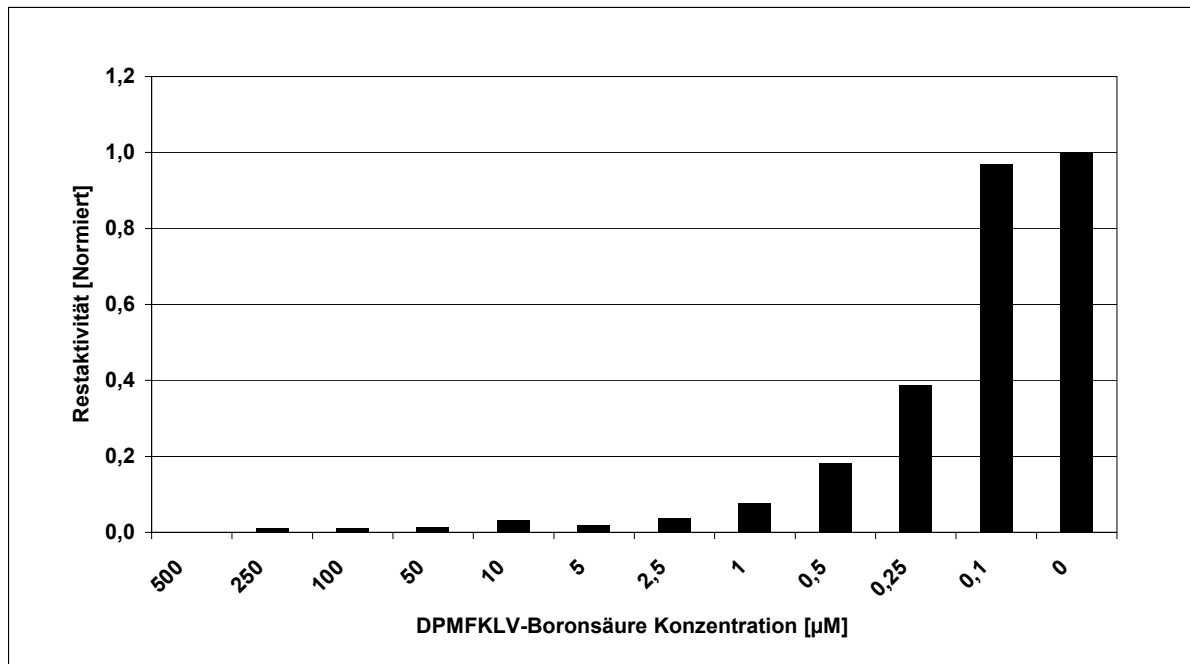


Abb. 5.12.b Konzentrationsreihe des DPMFKLV-Boronsäure Inhibitors

0,1 µM DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8) mit sinkenden Konzentrationen (0-500 µM) der DPMFKLV-Boronsäure vorinkubiert. 0,5 mM des SPMFKGV-pNA Substrates wurden zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA₄₀₅ für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert und gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen (Standardabweichung < 10%).

Nur der bereits bekannte Inhibitor SPMFKGV-CMK konnte bei äquimolaren Verhältnissen zum Substrat eine vollständige Inhibierung der Enzymaktivität erreichen. Alle anderen putativen Inhibitoren wirkten entweder gar nicht oder zeigten selbst bei einer Endkonzentration von 0,5 mM keine 50%ige Inhibierung.

Aufgrund der Ergebnisse konnte eine unspezifische Inhibierung durch die CMK-Derivate ausgeschlossen werden.

5.6.3. Beweis einer nicht-kompetitiven Inhibierung

Bei den bisher entwickelten Inhibitoren handelt es sich um Sequenzhomologe zu den Substraten. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Inhibierung um eine aufgrund der Sequenzhomologie auftretende kompetitive Hemmung handelt.

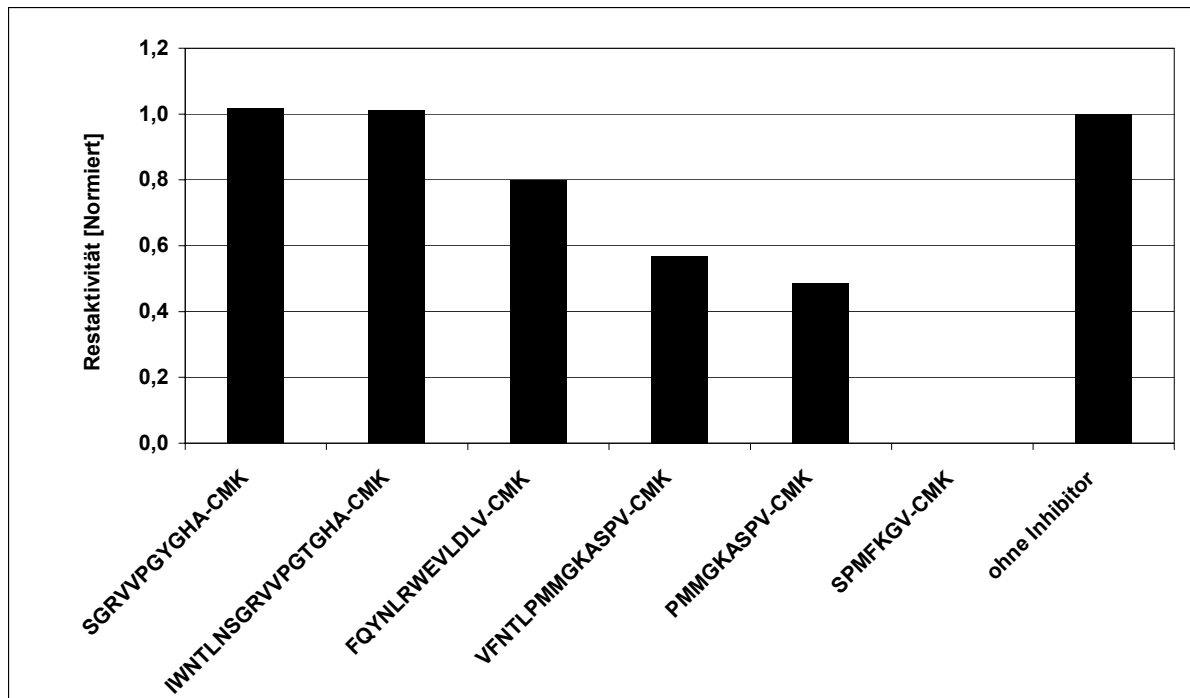


Abb. 5.13. Test von weiteren putativen CMK Inhibitoren

1 μM DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8) mit 0,5 mM eines der sechs CMK-Derivate vorinkubiert. 0,5 mM des SPMFKGV-pNA Substrates wurde zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert. Als Positivkontrolle diente der SPMFKGV-CMK Inhibitor. Die Standardabweichung betrug < 12%.

Als Nachweis, dass es sich um eine nicht-kompetitive Inhibierung handelt, wurde ein Verdau von MaIS mit DegP durchgeführt. MaIS wurde nach Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und in 8 M Harnstoff gelagert¹. Da DegP bei steigenden Harnstoff-Konzentrationen seine Enzymaktivität verliert, wurde das gereinigte MaIS so konzentriert, dass die Harnstoff-endkonzentration im Enzymassay auf 300 mM reduziert werden konnte. Bei dieser Konzentration zeigt DegP eine etwa 88%ige Restaktivität (Spiess, 1999).

DegP wurde wie in den bisherigen Enzymassays mit pNA Substrat in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, MaIS in einer Konzentration von 1,25 μM und das SPMFKGV-CMK in einer Endkonzentration von 0,5 mM. In Abständen von 15 bzw. 30 min wurden Proben entnommen und unter reduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Gel analysiert (Abb. 5.14.).

¹ MaIS Reinigung und Denaturierung wurde von Dr. Merdanovic durchgeführt

Das Ergebnis zeigt, dass der MalS Verdau durch DegP vollständig über den untersuchten Zeitraum inhibiert wird. Dies bestätigt die pNA Enzymtests und zeigt, dass der erste synthetische Inhibitor für DegP entwickelt werden konnte.

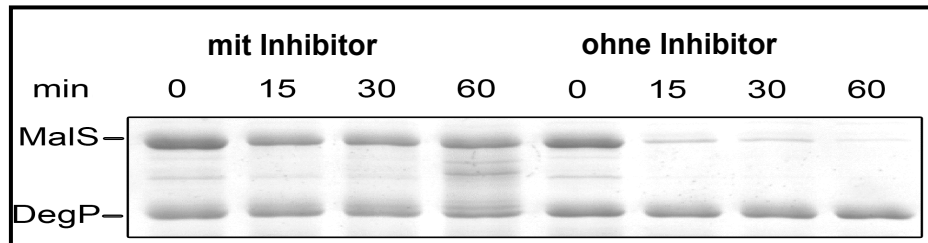


Abb. 5.14. MalS Verdau durch DegP mit und ohne Inhibitor

1 μM DegP wurde mit 0,5 mM SPMFKGV-CMK 5 min vorinkubiert und dann 1,25 μM MalS in den Reaktionsansatz (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) bei 37°C eingesetzt. SDS-Gelproben wurden zu den genannten Zeitpunkten entnommen. Die Auftrennung erfolgte mittels 12%igem SDS Gel und anschließender Coomassie-Blau Färbung.

5.7. Allosterische Aktivierung von DegP

5.7.1. Aktivierung der DegP Enzymaktivität durch kleine Stresspeptide

Für DegS, ein weiteres Mitglied der HtrA-Familie in *E. coli*, wurde 2004 erstmals die Röntgenkristallstruktur im aktiven Zustand gelöst (Wilken *et al.*, 2004). In diesem aktiven Zustand ist ein Aktivator an der PDZ Domäne von DegS gebunden. Dieser Aktivator hat die C-terminale Konsensussequenz -YXF, abgeleitet vom C-Terminus der Außenmembranproteine (OMP) von *E. coli*. Diese C-Termini werden erst durch eine Fehlfaltung des Proteins nach außen zugänglich, so dass diese Zugänglichkeit als Stresssensor dient. Der Rest X der Konsensussequenz -YXF interagiert bei der Bindung an die PDZ Domäne von DegS zusätzlich mit einem der Loops der Protease Domäne. Hierdurch wird die Proteaseaktivität von DegS reguliert. Zudem zeigte die Studie von Wilken *et al.* (Wilken *et al.*, 2004), dass die

DegS Aktivierung nicht nur von der Bindungsaffinität, sondern auch von der chemischen Eigenschaft des Restes X abhängt.

Aufgrund der Ergebnisse für DegS konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass DegP neben seiner bekannten temperaturabhängigen Aktivierung (Spiess *et al.*, 1999) eine zu DegS ähnliche allosterische Aktivierung durch sogenannte Stresspeptide besitzen könnte.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurden analoge Decapeptide von bekannten Stresssignalkonsensussequenzen DNRLGLVYXF synthetisiert. Von allen möglichen Kombinationen wurden 10 Peptide synthetisiert und ihr Einfluss auf die proteolytische Aktivität von DegP getestet. Zusätzlich wurden noch Decapeptide der C-Termini vom Außenmembranprotein OmpC, dem periplasmatischen Protein Alkalische Phosphatase (PhoA) und der α -Amylase (MalS) getestet. Von diesen war OmpC bereits als DegS Aktivator bekannt und PhoA diene als Negativkontrolle.

Im ersten Schritt wurden Standardaktivitätstests mit dem Substrat SPMFKGV-pNA jeweils mit und ohne putativen Aktivator durchgeführt. Diese wurden quantifiziert und auf die Probe ohne Aktivatorpeptid normiert (Abb. 5.15.).

Die Zugabe von kleinen Peptiden, die als Stresssensoren dienten, führte zu einer Proteaseaktivierung von DegP. Die Peptide mit der C-terminalen Sequenz -YFF und -YWF zeigten eine Aktivierung von DegP um einen Faktor 2,5 bzw. 2, das Peptid mit dem C-Terminus -YQF, was der nativen Sequenz des Stresssensorproteins OmpC entspricht, führte zu einer 1,5fachen Aktivierung. Interessanterweise aktivierte das Decapeptid des Original C-Terminus von OmpC mit einem Faktor von 3 die enzymatische Aktivität von DegP am stärksten. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass DegP neben seiner temperaturabhängigen Aktivierung auch einer allosterischen Aktivierung unterliegt.

Zur Kontrolle, dass der hier bestimmte aktivierende Effekt nicht damit zu begründen ist, dass der Enzymtest mit einem kleinen synthetischen pNA Substrat durchgeführt wurde, wurde eine Proteolyse von MalS durch DegP unter aktivierenden Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde ein Ansatz mit dem stärksten Aktivator (C-Terminus von OmpC), einer mit einem schwach aktivierenden Decapeptid (-YFF) und ein Ansatz ohne Aktivator analysiert. In Abständen von 2,5 min wurden Proben für die Analyse auf einem reduzierenden SDS-Gel genommen (Abb. 5.16.).

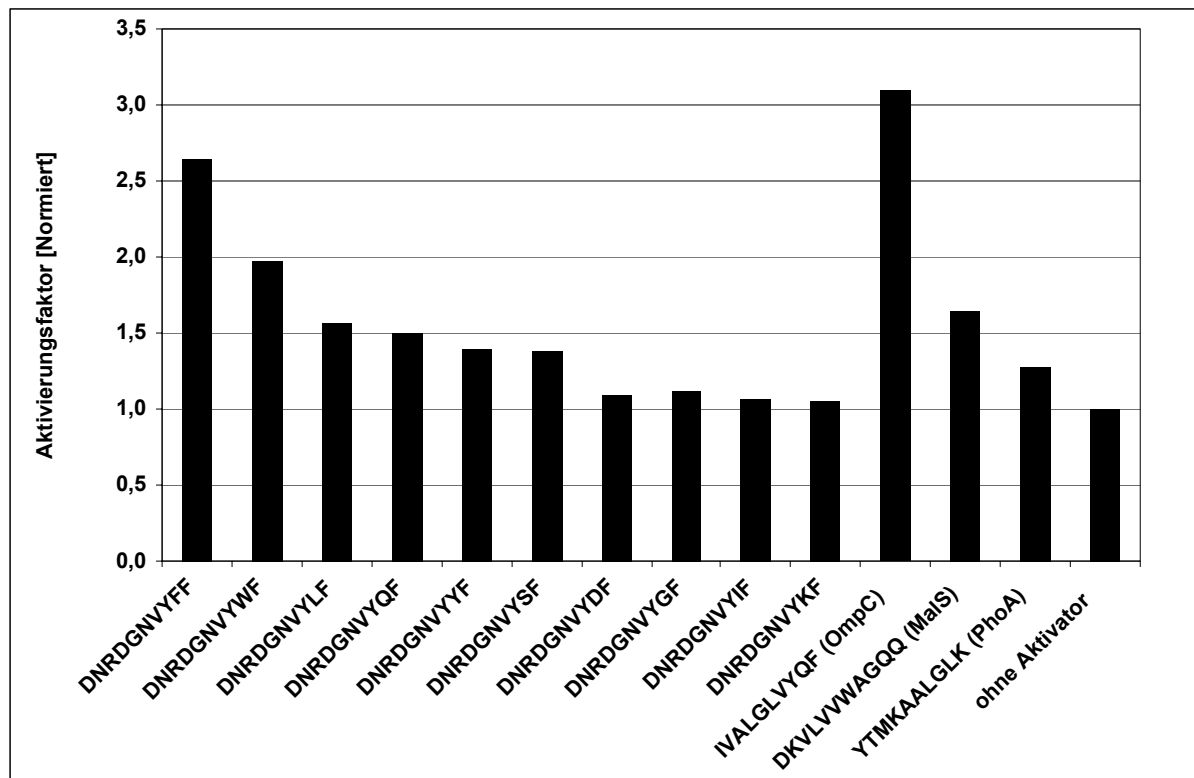


Abb. 5.15. Einfluss von putativ aktivierenden Peptiden auf die spezifische Enzymaktivität von DegP

Aktivitätstestsbedingungen: 0,5 mM SPMFKGV-pNA, 50 μ M aktivierende Peptide, 1 μ M DegP, 50 mM Na_2PO_4 pH 8,0, Temperatur 37°C. Die spezifische Aktivität wurde auf die Aktivität der Probe ohne aktivierendes Peptid normiert. Die Standardabweichung lag bei < 18%.

Ohne aktivierendes Peptid konnte nach 20 min nur ein etwa 40%iger Abbau von MalS durch DegP bestimmt werden. Durch Zugabe des schwachen Aktivatorpeptids -YYF, welches im pNA Enzymtest eine etwa 1,4fache Aktivierung zeigte, konnte der Abbau nach 20 min auf etwa 60% erhöht werden. Durch Zugabe des besten Aktivators, dem Decapeptid des OmpC C-Terminus, konnte eine vollständige Proteolyse von MalS durch DegP detektiert werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass eine allosterische Aktivierung durch kleine Stresssensorpeptide bei DegP vorliegt.

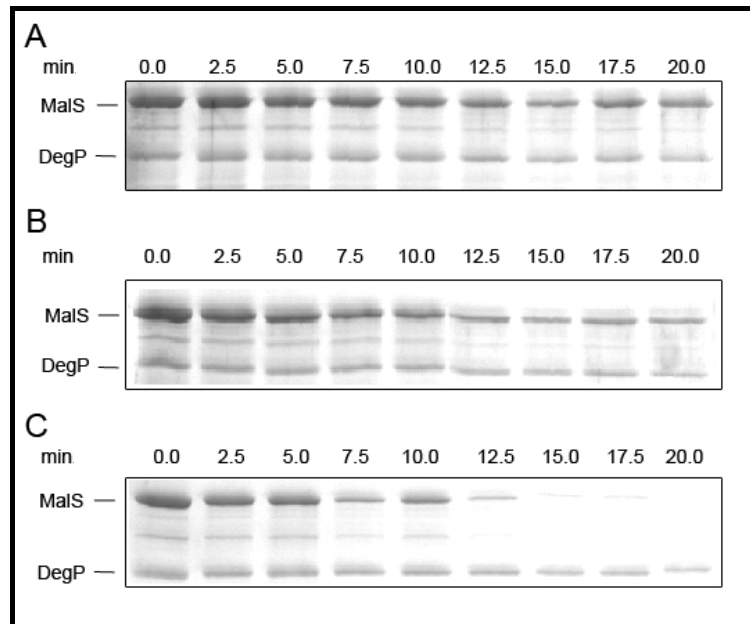


Abb. 5.16. MaIS Abbau unter aktivierenden Bedingungen

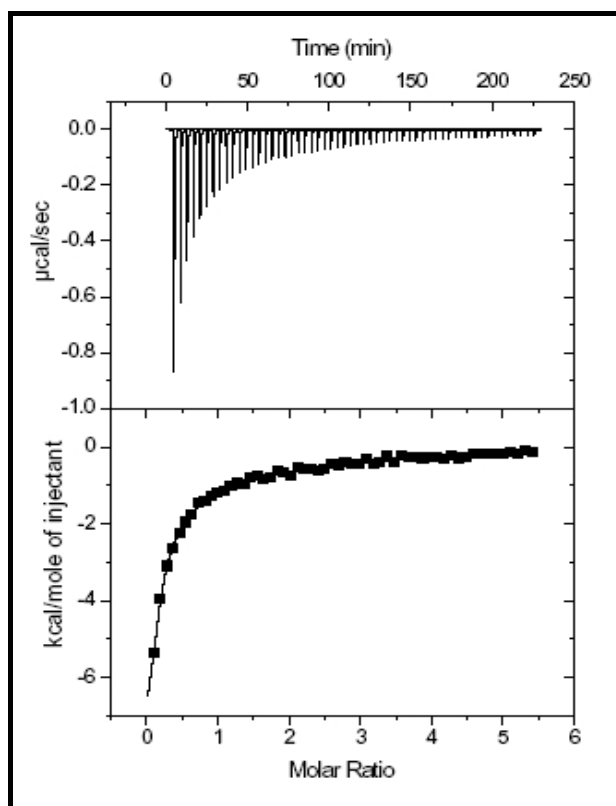
1 μ M DegP wurden 5 min mit 50 μ M aktivierenden Peptiden vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 μ M MaIS in den Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0) bei 37°C. Probenentnahme erfolgte nach jeweils 2,5 min. Der Nachweis erfolgte mittels SDS-Gel und anschließender Coomassie-Blau Färbung. A. MaIS Verdau durch DegP; B. MaIS Verdau durch DegP mit Aktivatorpeptid YYF; C. MaIS Verdau durch DegP mit Decapeptid OmpC

5.7.2. Isothermale Titrations Kalorimetrie von aktivierenden Peptiden

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der aktivierenden Peptide von DegP wurden Isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) Versuche durchgeführt¹. Hierbei wurde mit der proteolytisch inaktiven DegP_{S210A} Mutante gearbeitet, da die Autoproteolyse von DegP als eine chemische Reaktion in der ITC ein Störsignal erzeugt, welches die Auswertung der Aktivatorbindung verhindert. Da der beste Aktivator, der OmpC C-Terminus, in den für die ITC benötigten Konzentrationen in Pufferlösungen nicht löslich war, wurde der zweitbeste Aktivator DNRLGLVYFF (2,5fache Aktivierung) benutzt. Als ein nur schwach aktivierendes Peptid wurde DNRLGLVYLF (1,4fache Aktivierung) ausgewählt. Die ITC Daten konnten nach einer „Drei sequenziellen Bindestellen“ Auswertung gefittet werden, da eine Kooperativität innerhalb von DegP zwischen den drei Bindestellen für das aktivierende Peptid vorliegt (Abb. 5.17.).

¹ Die ITC Messungen wurden in laborinterner Kooperation mit N. Kucz durchgeführt

Hierbei handelt es sich um eine positive Kooperativität zwischen der ersten und der zweiten Bindestelle. Die Dissoziationskonstante (K_D s) und die totale Enthalpie (ΔH_{tot}) für die Bindung konnte für beide Peptide bestimmt werden (Tab. 5.4.). Die Enthalpie ist schwach exotherm, d.h. es wird geringfügig Energie frei. Die bestimmten K_D s zwischen 6,7 bis 40,6 μM zeigen, dass es sich hierbei um eine schwache Bindung des Aktivators an DegP handelt. Des weiteren unterscheidet sich nur die Bindungsaffinität zur ersten Bindestelle zwischen dem -YFF und -YLF Peptid geringfügig. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bindung der beiden Peptide bestimmt werden.



Tab. 5.4. K_D s und ΔH_{tot} der aktivierenden Peptide DNRLGLVYLF und DNRLGLVYFF

Peptid	K_D [μM]	ΔH_{tot} [kcal/mol]
-YLF	40,6	-0,15
	7,6	
	26,0	
-YFF	26,5	-3,81
	6,7	
	23,0	

Abb. 5.17. Bindung von DNRLGLVYLF an DegP_{S210A}

Die Bindung des Aktivatorpeptids DNRLGLVYLF (Konz. 1 mM, 5 μL Aliquots) an DegP (Konz. 20 μM) wurde per ITC analysiert. Protein und Peptid waren in 50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl pH 8 gelöst. Die Daten wurden nach einem Modell der „Drei sequenziellen Bindestellen“ gefittet.

Wilken *et al.* (Wilken et al., 2004) postulierte, dass die DegS Aktivierung nicht nur von der Bindungsaffinität, sondern auch von der chemischen Eigenschaft des Restes X der Konsensusaktivatorsequenz -YXF abhängt. Gleiches kann aufgrund der

Ergebnisse der proteolytischen Enzymtests und der ITC auch für DegP postuliert werden. Die Unterschiede in der allosterischen Aktivierung von DegP können nicht hauptsächlich durch die Bindungsaffinität der Aktivatorpeptide, sondern durch die chemischen Eigenschaften der vorletzten Aminosäure dieser Peptide begründet werden.

5.7.3. Die allosterische Aktivierung dominiert über die temperaturabhängige Aktivierung

Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) zeigte, dass DegP eine Doppelfunktion als Chaperon und Protease aufweist. Bei niedrigen Temperaturen ($< 37^{\circ}\text{C}$) dominiert die Chaperonfunktion von DegP. Steigende Temperaturen führen zu einer Erhöhung der Proteasefunktion. Durch die unter 5.7.1. *Aktivierung der DegP Enzymaktivität durch kleine Stresssensorpeptide* genannten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass DegP einer allosterischen Aktivierung unterliegt. Im folgenden sollte untersucht werden, ob auch bei niedrigen Temperaturen durch die Zugabe von aktivierenden Peptiden die Protease- über die Chaperonfunktion dominieren kann.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein Versuchssystem aufgestellt, in dem die Chaperonaktivität von DegP unter nicht aktivierenden Bedingungen dominiert. DegP wurde mit ungefaltetem MalS bei 22°C inkubiert. Unter diesen Versuchsbedingungen faltet DegP in einer Konzentration von $0,36\text{ }\mu\text{M}$ das ungefaltete MalS in einer Konzentration von $1,3\text{ }\mu\text{M}$ effizient innerhalb etwa 1 h vollständig zurück (Abb. 5.18.). Wurde jedoch DegP 5 min mit dem Aktivatorpeptid DNRLGLVYFF ($50\text{ }\mu\text{M}$) vorinkubiert und dann das ungefaltete MalS hinzugegeben, so konnte ein vollständiger Abbau des ungefalteten MalS innerhalb von 0,5 h bestimmt werden (Abb. 5.18.). Das Ergebnis zeigt, dass die allosterische Aktivierung über die temperaturabhängige Aktivierung dominiert. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass DegP *in vivo* nicht nur bei erhöhter Temperatur, sondern auch bei allgemeinem Stress, signalisiert durch Stresspeptide, aktiviert wird.

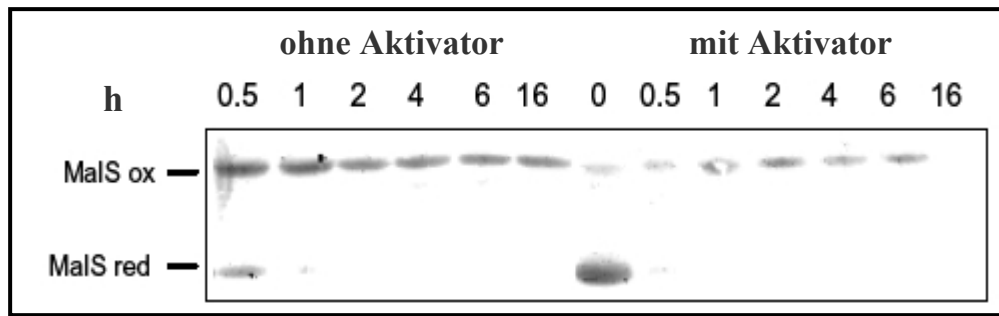


Abb. 5.18. MaS Rückfaltung durch DegP mit und ohne Aktivator

1,3 μM chemisch ungefaltetes MaS wurde mit 0,36 μM Wildtyp DegP in 250 mM NaH_2PO_4 pH 8,0 in Anwesenheit und Abwesenheit von 50 μM aktivierenden Peptiden (DNRLGLVYFF) bei 22°C inkubiert. An den genannten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Proteine TCA gefällt und in SDS-Probenpuffer ohne DTT aufgenommen. Nach dem SDS-Gel wurde die S-S gebundene (MaS ox) und ungebundene (MaS red) Form von MaS mittels Western Blot mit polyklonalem Antikörper gegen MaS nachgewiesen.

5.7.4. Allosterische Aktivierung von DegP durch Zugabe von Vollängenproteinen und Proteolysefragmenten

5.7.4.1. Die Vorinkubation mit MaS, β -Casein und OmpC erhöht die spezifische Aktivität von DegP

Um den möglichen *in vivo* Hintergrund der allosterischen Aktivierung zu klären, wurden denaturierte Proteine (MaS, OmpC) bzw. Protein ohne große Sekundärstrukturen (β -Casein), welche ein Stresssignal simulieren sollten, mit DegP vor dem pNA Aktivitätstest inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte eine Bestimmung der Enzymaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl denaturiertes MaS, als auch β -Casein, in einer Konzentration von 3 μM die spezifische Aktivität von DegP um einen Faktor von 2,6 bzw. 3 erhöht. Da OmpC in einem hochkonzentrierten SDS-Lagerungspuffer vorlag, konnte das Protein nur in sehr geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Es zeigte sich jedoch, dass bei einer Konzentration von nur 25 nM eine Erhöhung der spezifischen Aktivität um einen Faktor von 2,6 erreicht werden kann (Abb. 5.19.). Bei entsprechender Konzentration von β -Casein und MaS konnte keine Aktivierung von DegP nachgewiesen werden.

5.7.4.2. Allosterische Aktivierung von DegP durch Proteolysefragmente von β -Casein

Um zu zeigen, dass die unter 5.7.4.1. *Die Vorinkubation mit MalS, β -Casein und OmpC erhöht die spezifische Aktivität von DegP* bestimmte DegP Aktivierung möglicherweise nicht nur durch die eingesetzten Vollängenproteine selbst, sondern vielleicht auch durch die bei der Vorinkubation des β -Casein mit DegP entstandenen Proteolysefragmente verursacht wurde, sollten gereinigte Proteolysefragmente im Enzymassay getestet werden. Hierfür wurde β -Casein mit DegP über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend eine Acetonfällung durchgeführt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit DegP und unverdaulichem β -Casein verworfen und der Überstand eingedampft. Das entstandene Pellet mit den Proteolysefragmenten wurde in Aqua dest. aufgenommen. Die Proteolysefragmente wurden auf Verunreinigungen durch nicht verdautes Protein und DegP auf einem SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung kontrolliert.

Im Vergleich zum Vollängenprotein β -Casein wurden gleiche Mengen verdautes β -Casein in den Enzymassay eingesetzt. Diese Proteolysefragmente aktivierten die Proteasefunktion von DegP um einen Faktor von 8 (Abb. 5.19.). Das zeigt, dass DegP einer allosterischen Aktivierung unterliegt, wobei die aktivierenden Peptide durch den enzymatischen Abbau von Substraten entstehen. Diese Art der enzymatischen Regulation wird positive Autoregulation genannt.

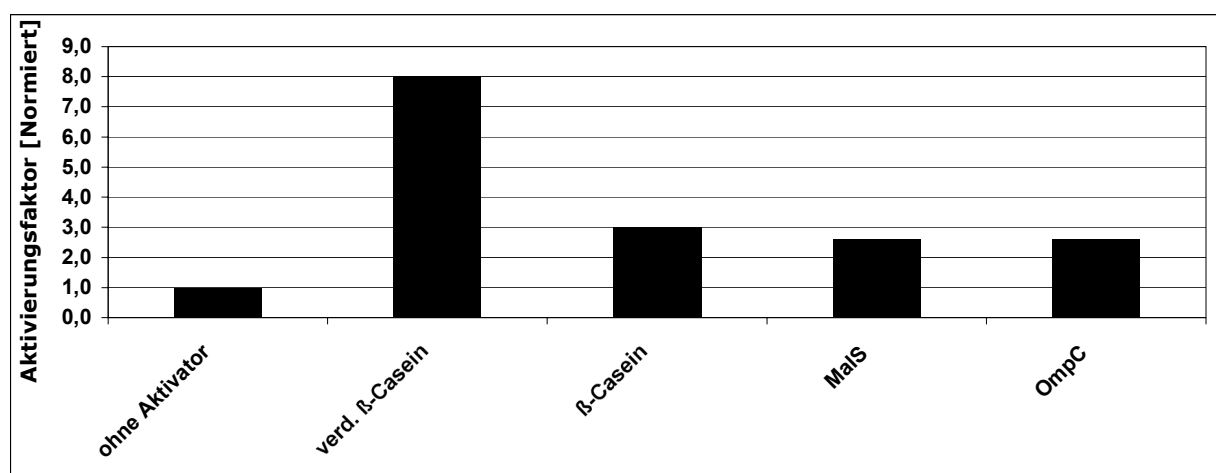


Abb. 5.19. Allosterische Aktivierung durch MalS, β -Casein und OmpC

1 μ M DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8) mit 3 μ M MalS, 3 μ M (entspricht 5 μ g) β -Casein, 5 μ g verdaulichem β -Casein bzw. 25 nM OmpC vorinkubiert. 0,5 mM des SPMFKGV-pNA Substrates wurden zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Aktivator normiert. Die Standardabweichung betrug < 10%.

5.8. Analysen des oligomeren Zustandes von DegP

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass das Trimer die funktionelle Untereinheit von DegP ist. Darüber hinaus konnte bereits die Kristallstruktur des Hexamers aufgelöst werden. In weiteren Oligomeranalysen konnten zudem in geringen Mengen ein Dodecamer von DegP bestimmt werden (Kolmar *et al.*, 1996, Krojer *et al.*, 2002, Clausen *et al.*, 2002).

Um Aufschluss über den oligomeren Zustand des gereinigten DegPs unter unterschiedlichen Bedingungen zu erhalten, wurden Gelfiltrationen, Cross-Links und analytische Ultrazentrifugationen durchgeführt.

5.8.1. Oligomerer Zustand von DegP bei 4°C und 43°C

Für DegP ist eine temperaturabhängige Aktivierung bekannt. Um den oligomeren Zustand bei niedrigen (4°C) und bei hohen Temperaturen (43°C), bei denen die proteolytische Aktivität von DegP dominiert, zu untersuchen, wurden Gelfiltrationen durchgeführt und analysiert. Dafür wurde eine Superdex200-Gelfiltrationssäule mit temperierbarem Außenmantel an ein Wasserbad mit integrierter Pumpe angeschlossen. Für die Messungen bei 4°C wurde die Säule zusätzlich in einem Kühlschrank angebracht. Die Kalibrierung erfolgte bei beiden Temperaturen mit einem Kalibrierungskit von GE-Healthcare in einem Bereich von 14 kDa bis 440 kDa. Da die Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf die Kalibrierung hatte, konnte aus beiden Kalibrierungen zusammen nach Herstellerangaben eine graphische Auftragung vom natürlichen Logarithmus des Molekulargewichts gegen den berechneten Wert K_{av} abgeleitet werden (Abb. 5.20.). Aus der so bestimmten Geradengleichung konnte dann das Molekulargewicht der in weiteren Versuchen zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

Für die Analyse des oligomeren Zustandes wurden jeweils 1 bis 3 mg des gereinigten DegPs auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Es wurde sowohl das wildtypische DegP, als auch die proteolytisch inaktive Variante DegP_{S210A} getestet. Insbesondere bei höheren Temperaturen konnte beim Wildtypen ein sehr starker Eigenabbau detektiert werden. Insgesamt zeigten aber beide DegP Varianten ein

vergleichbares Ergebnis. Sowohl bei 4°C, als auch bei 43°C konnte jeweils ein Hauptpeak bei einem Molekulargewicht von 275 kDa bzw. 292 kDa bestimmt werden. Somit wurde als höchstes Oligomer ein Hexamer (erwartetes Molekulargewicht etwa 283 kDa) detektiert werden. Kleinere Oligomere beim Wildtypen konnten durch Eigenabbau begründet werden, da sie bei der proteolytisch inaktiven Mutante nicht auftraten (Abb. 5.21.).

Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass die temperaturabhängige Aktivierung von DegP in einer Veränderung des oligomeren Zustandes begründet ist.

Die folgenden Gelfiltrationen konnten aufgrund dessen, dass die Temperatur keinen Einfluss auf die Oligomerisierung zeigte, bei 4°C durchgeführt werden, so dass der Eigenabbau von DegP und seinen Derivaten auf ein Minimum reduziert werden konnte.

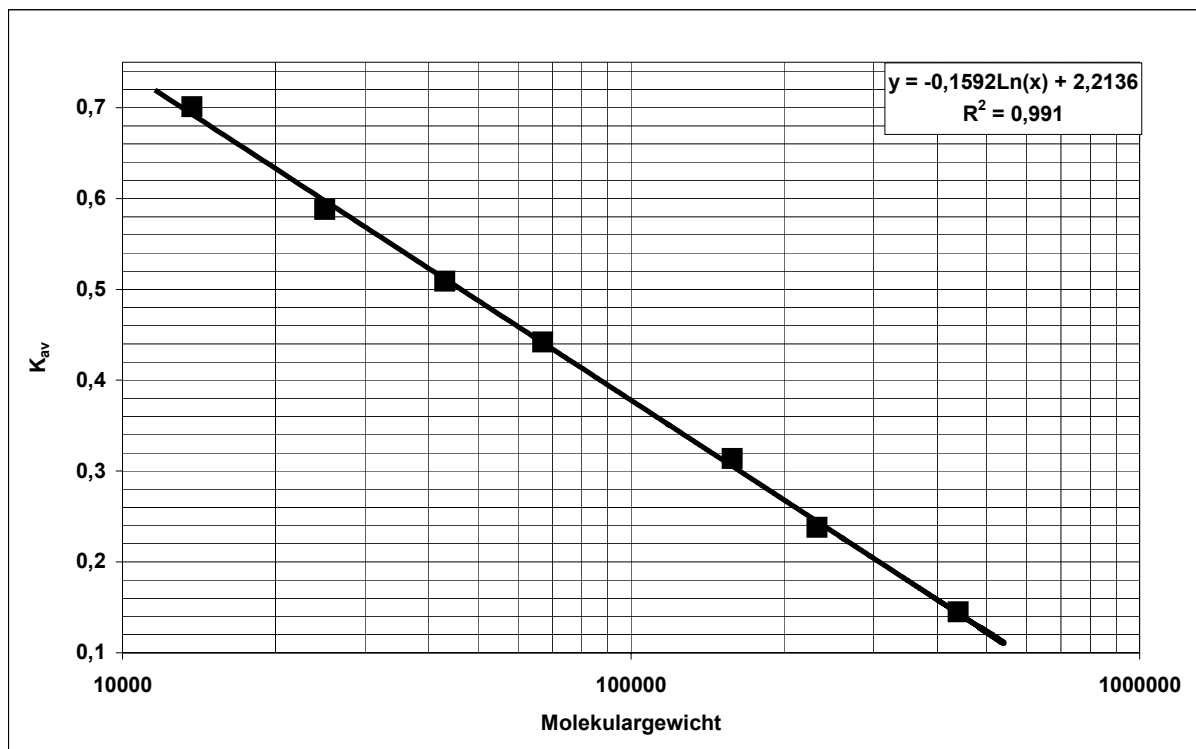


Abb. 5.20. Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex200

Die Kalibrierung erfolgte nach Herstellerangaben von GE-Healthcare für das Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW. Für die Superdex200 Säule erfolgte die Kalibrierung mit RibonucleaseA (14 kDa), ChymotrypsinogenA (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Albumin (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Catalase (232 kDa) und Ferritin (440 kDa). Das Leervolumen der Säule wurde mit Dextran2000 bestimmt. Die Kalibrierung ergab einen Bestimmtheitsgrad (R^2) von 0,991.

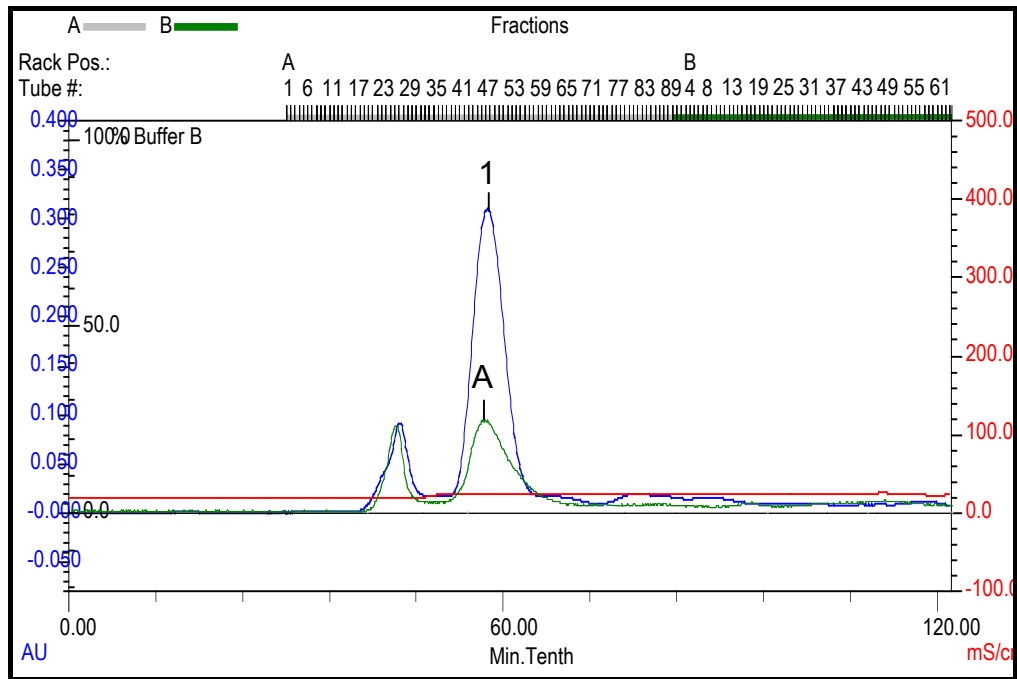


Abb. 5.21. Überlagerung der Gelfiltrationsanalysen bei 4°C und 43°C

Je 1-3 mg gereinigtes DegP_{S210A} wurden mittels Gelfiltration auf einer Superdex200 analysiert. Es wurden Gelfiltrationen bei 4°C (blaue Linie) und 43°C (grüne Linie) durchgeführt. Aufgrund des Elutionsvolumens und anhand der Kalibrierung (Abb. 5.20.) konnte das Molekulargewicht der Proteinproben bestimmt werden. Elutionspeak 1 (DegP bei 4°C) ergab ein Molekulargewicht von 275 kDa und Elutionspeak A (DegP bei 43°C) von 292 kDa.

5.8.2. Veränderung des oligomeren Zustandes von DegP durch Zugabe von aktivierenden Peptiden

5.8.2.1. Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels Gelfiltration

Die unter 5.7. *Allosterische Aktivierung von DegP* dargestellten Ergebnisse zeigen eine Erhöhung der proteolytischen Aktivität von DegP durch Zugabe von unterschiedlichen Aktivatoren. Da β -Casein in großen Mengen vorhanden war und als Komplettverdau DegP um bis zu einem Faktor 8 aktiviert (5.7.4.2. *Allosterische Aktivierung von DegP durch Proteolysefragmente von β -Casein*), wurde sowohl β -Casein als auch verdautes β -Casein für die Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen getestet. DegP wurde mit den

aktivierenden Proteinen bzw. Proteolysefragmenten für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Oligomerisierungsanalyse mittels Gelfiltration bei 4°C. Aufgrund Grund der ermittelten Elutionsvolumina konnte das Molekulargewicht der Proteine bestimmt werden. Als Kontrolle wurden DegP, β -Casein und verdautes β -Casein alleine aufgetragen und analysiert. Zusätzlich wurden Kontrollen bei 37°C analysiert, die jedoch außer dem verstärkten Eigenabbau keine Veränderungen zeigten.

Die Ergebnisse für DegP mit β -Casein und verdaulichem β -Casein zeigten keinen signifikanten Unterschied, beide Aktivatorarten führten durch die Vorinkubation mit DegP zu einer Veränderung des Oligomerisierungszustands von DegP. Da diese höheren Oligomere aufgrund ihres hohen Molekulargewichts nicht mehr durch die Superdex200 Gelfiltrationssäule aufgelöst werden konnten, wurde der Versuch auf einer Superose6 Gelfiltrationssäule, ebenfalls von GE-Healthcare, wiederholt. Diese wurde in einem Bereich von 158 kDa bis 669 kDa nach Herstellerangaben mit dem Gelfiltrationskalibrierungskit LMW & HMW von GE-Healthcare kalibriert.

DegP ohne Aktivator lag, wie bereits unter *5.8.1. Oligomerer Zustand von DegP bei 4°C und 43°C* gezeigt, hauptsächlich als Hexamer (Peak A) vor. Die Zugabe des verdauten β -Caseins führte zu einer Erhöhung der Oligomerisierung (Abb. 5.22. und Tab. 5.5.). Neben dem Hauptpeak (Peak 2), welcher nach Auswertung dem Molekulargewicht eines Dodecamers (erwartetes Molekulargewicht 576 kDa) entsprach, konnte noch ein weiterer Peak (Peak 1) im hochmolekularen Bereich bestimmt werden, der einem Molekulargewicht von etwa einem 24mer (erwartetes Molekulargewicht 1,15 MDa) entspricht. Die Abweichungen insbesondere im oberen Bereich sind damit zu begründen, dass die Methode der Gelfiltration mit den käuflich erwerblichen Säulen nicht für eine Analyse des Molekulargewichts über 1.000 kDa ausgelegt ist. Infolgedessen und zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Cross-Link Versuche zwischen DegP und den Aktivatoren durchgeführt und die Methode der analytischen Ultrazentrifugation genutzt.

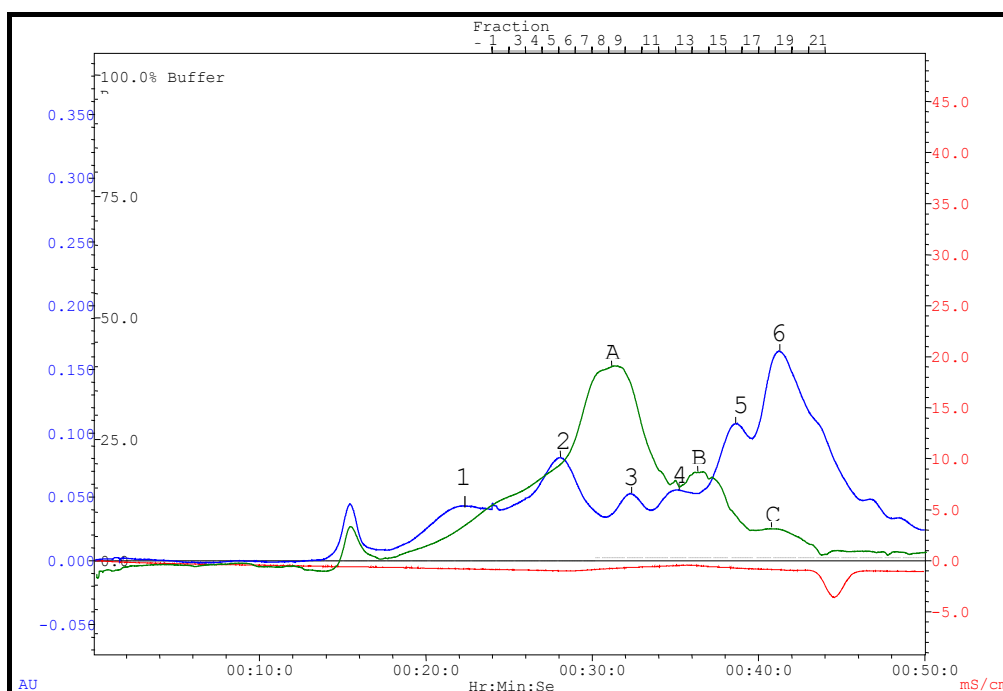


Abb. 5.22. Überlagerung der Gelfiltrationsanalysen unter (nicht-)aktivierenden Bedingungen

1 mg DegP wurde alleine (grüne Linie) bzw. mit 50 µg verdautem β -Casein (blaue Linie) nach einer 5 minütigen Vorinkubation bei 37°C mittels Gelfiltration (Superose6 Säule) auf den Oligomerisierungszustand hin analysiert. Das Molekulargewicht der Proteine mit detektierten Elutionspeaks wurde durch die vorherige Kalibrierung der Säule bestimmt (Tab. 5.5.a und Tab. 5.5.b).

Tab. 5.5.a Oligomerisierung von DegP unter nicht-aktivierenden Bedingungen

Peak	MW (kDa)	Oligomer/Zusatz
A	295	6,1
B	107	2,5
C	51	1,1

Tab. 5.5.b Oligomerisierung von DegP unter aktivierenden Bedingungen

Peak	MW (kDa)	Oligomer/Zusatz
1	1185	24,6
2	536	11,2
3	254	5,3
4	156	3,2
5	84	verd. β -Casein
6	53	verd. β -Casein

5.8.2.2. Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels Cross-Link Analyse

Zur Bestätigung der Ergebnisse von 5.8.2.1. *Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels Gelfiltration* wurde die Methode des Cross-Links etabliert. Die Vorteile dieser Methode im Vergleich zur Gelfiltration sind zum einen die Möglichkeit, sowohl das Monomer als auch das 24mer gleichzeitig in einer Messung zu detektieren, und zum anderen mit relativ niedrigen Proteinmengen zu arbeiten.

Da in der Gelfiltration gezeigt werden konnte, dass sich DegP Wildtyp und die proteolytisch inaktive DegP_{S210A} Mutante in ihrer Oligomerisierung nicht unterscheiden, wurde auch in den Cross-Link Experimenten mit der inaktiven Variante, die keiner Autoproteolyse unterliegt, gearbeitet. Es wurden unterschiedliche Versuchsbedingungen getestet. Die Konzentrationsbereiche des Proteins und des Cross-Linkers Glutaraldehyd und die Inkubationszeiten wurden variiert. Für DegP konnte eine Konzentration von 2 µM und für Glutaraldehyd von 0,1% bei einer Inkubationszeit von 2 min als optimal bestimmt werden. Ebenso wurden die Bedingungen für das aktivierende Protein β -Casein bzw. Proteolysefragmente von β -Casein getestet. Für β -Casein wurde eine Konzentration von 5 µM für die weiteren Versuche festgelegt (Abb. 5.23.a) und für die Proteolysefragmente wurden 5 µg in einem Ansatz von 40 µl gewählt.

Unter diesen Bedingungen konnte für DegP_{S210A} eine deutliche Verschiebung der Oligomerisierung vom Hexamer zum Dodecamer bzw. 24mer bestimmt werden (Abb. 5.23.a und Abb. 5.23.b). Neben diesen oligomeren Zuständen konnten aufgrund der Versuchsbedingungen, die kein dynamisches Gleichgewicht, sondern eine statische Aufnahme der Oligomerisierung darstellen, auch sogenannte Zwischenstufen der Oligomerisierung in Form von Monomer, Dimer, Trimer und 9mer detektiert werden. Diese oligomeren Zwischenstufen konnten in der Gelfiltration nicht nachgewiesen werden, da sich während des Versuchs ein sogenanntes dynamisches Gleichgewicht eingestellt hatte. Insgesamt konnte jedoch die Aussage bestätigt werden, dass DegP aufgrund der Bindung von Aktivatoren in Form von β -Casein bzw. verdautem β -Casein seinen oligomeren Zustand vom Hexamer zum Dodecamer bzw. 24mer ändert.

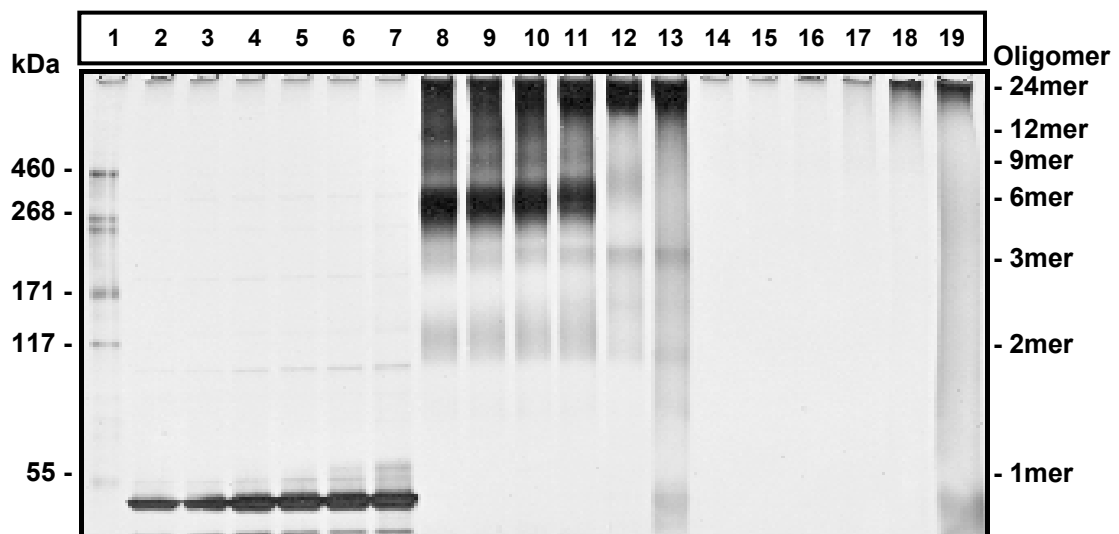


Abb. 5.23.a Cross-Link von DegP mit verschiedenen β -Casein Konzentrationen

2 μ M DegP wurde allein bzw. mit steigenden Konzentrationen β -Casein im Reaktionspuffer für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Cross-Linkers Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v). Nach der Probenentnahme am Zeitpunkt 0 und 2 min wurde die Reaktion durch die Zugabe der Stopplösung (1:10) unterbrochen und der Ansatz für 10 min in dieser inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 40°C für 10 min und eine elektrophoretische Auftrennung der Proben mittels NuPAGE Novex Midi Gel (Invitrogen). Im Anschluss wurde eine Silberfärbung durchgeführt. 1.) NuPAGE Novex Proteinmarker; 2.) DegP_{S210A} mit 0,15 μ M β -Casein 0 min; 3.) DegP_{S210A} mit 0,5 μ M β -Casein 0 min; 4.) DegP_{S210A} mit 1 μ M β -Casein 0 min; 5.) DegP_{S210A} mit 5 μ M β -Casein 0 min; 6.) DegP_{S210A} mit 7,5 μ M β -Casein 0 min; 7.) DegP_{S210A} mit 10 μ M β -Casein 0 min; 8.) DegP_{S210A} mit 0,15 μ M β -Casein 2 min; 9.) DegP_{S210A} mit 0,5 μ M β -Casein 2 min; 10.) DegP_{S210A} mit 1 μ M β -Casein 2 min; 11.) DegP_{S210A} mit 5 μ M β -Casein 2 min; 12.) DegP_{S210A} mit 7,5 μ M β -Casein 2 min; 13.) DegP_{S210A} mit 10 μ M β -Casein 2 min; 14.) 0,15 μ M β -Casein 2 min; 15.) 0,5 μ M β -Casein 2 min; 16.) 1 μ M β -Casein 2 min; 17.) 5 μ M β -Casein 2 min; 18.) 7,5 μ M β -Casein 2 min; 19.) 10 μ M β -Casein 2 min

5.8.2.3. Analyse des oligomeren Zustandes von DegP unter aktivierenden Bedingungen mittels analytischer Ultrazentrifugation

Bei der Gelfiltration trat der Nachteil auf, dass Proteine wie das 24mer von DegP mit einem Molekulargewicht von über 1.000 kDa außerhalb der Kalibrierung der Gelfiltrationsmatrix lagen. Die Cross-Link Versuche haben den Nachteil, dass die gewonnenen Ergebnisse eine nur schlecht quantifizierbare, punktuelle Aufnahme der Oligomerisierung und kein dynamisches Gleichgewicht zeigen. Diese beiden Nachteile werden durch die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) umgangen, so dass diese Methode zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt wurde.

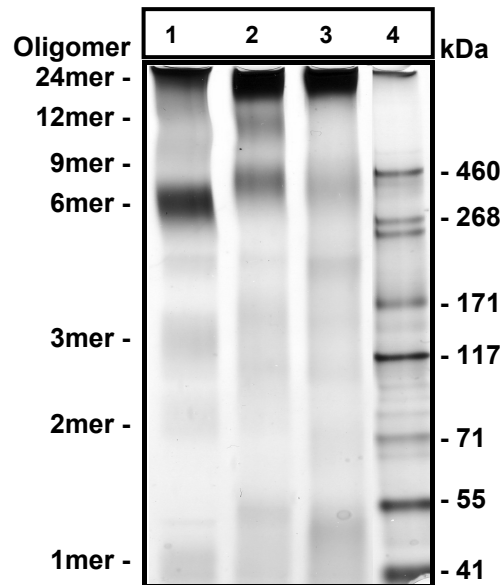


Abb. 5.23.b Cross-Link von DegP ohne Aktivator, mit β -Casein und mit Proteolysefragmenten vom Komplettverdau des β -Caseins

2 μ M DegP wurde unter Standardbedingungen (siehe Abb.5.23.a) mit 5 μ M β -Casein und 5 μ g verdaulichem β -Casein in den Cross-Link Versuch eingesetzt. Von jedem Ansatz wurde jeweils eine Probe nach 2 min entnommen und elektrophoretisch auf einem NuPAGE Novex Midi Gel aufgetrennt und anschließend silbergefärbt. 1.) DegP 2 min; 2.) DegP mit 5 μ M β -Casein 2 min; 3.) DegP mit 5 μ g verdauten β -Casein 2 min; 4.) NuPAGE Novex Proteinmarker

DegP wurde sowohl mit als auch ohne verdaulichem β -Casein untersucht. Im ersten Versuchsansatz wurden 50 μ M des proteolytisch inaktiven DegP_{S210A} bei 30°C in der AUZ¹ untersucht (Abb. 5.24.a).

Die so gewonnen Rohdaten wurden nach der Monte Carlo Analyse, wie unter 4.3.5.3. *Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)* erklärt, ausgewertet (Abb. 5.24.b und Tab. 5.6.a). Etwa 10% der Probe zeigten einen s-Wert von unter 1, wobei davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um Verunreinigungen bei der Proteinreinigung handelt, die aufgrund ihrer geringen Größe nur sehr langsam sedimentieren. Werden diese 10% von der Gesamtmenge abgezogen, so verteilt sich die restliche Proteinmenge auf die unterschiedlichen oligomeren Zustände wie folgt. Es konnte gezeigt werden, dass 64% des eingesetzten DegPs als Hexamer mit einem s-Wert von 10,9, knapp 23% als Dodecamer mit einem s-Wert von 20,6 und rund 13% als 24mer mit einem s-Wert von 27,5 vorlagen.

¹ Die AUZ Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Physikalische Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Im weiteren wurde DegP_{S210A} mit 40 µg verdautem β -Casein inkubiert und ebenfalls mittels AUZ untersucht (Abb. 5.24.c/d und Tab. 5.6.b). Die Rohdaten zeigen eine höhere Grenzschicht in der Absorption von etwa 1. Dies kann durch den eingesetzten Aktivator begründet werden. Das verdaute β -Casein hat ein sehr geringes Molekulargewicht (< 5 kDa) und sedimentiert nur sehr langsam mit einem s-Wert von etwa 2, wodurch die Erhöhung der Absorption im Bereich der Grenzschicht zu erklären ist.

Die durch die Monte Carlo Analyse berechnete Verteilung der oligomeren Zustände zeigte eine klare Veränderung zur Proteinprobe ohne Aktivator (Tab. 5.6.b). Über 76% des DegPs lagen als Dodecamer, etwa 21% als 24mer und nur noch 2% als Hexamer vor.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Tendenzen zur Hocholigomerisierung von DegP durch die Zugabe von Aktivatoren, wie sie bei Gelfiltration und Cross-Link Methode beobachtet wurde.

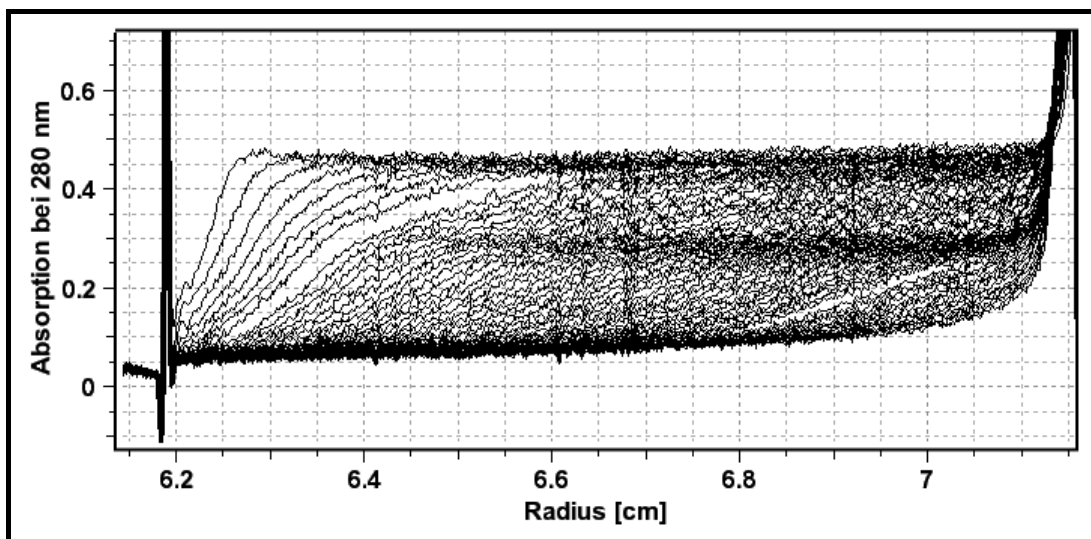


Abb. 5.24.a Rohdaten der AUZ von DegP_{S210A}

50 µM von DegP_{S210A} wurden in der analytischen Ultrazentrifugation bei 30°C untersucht und ihre Sedimentation bei einer Absorption von 280 nm gemessen.

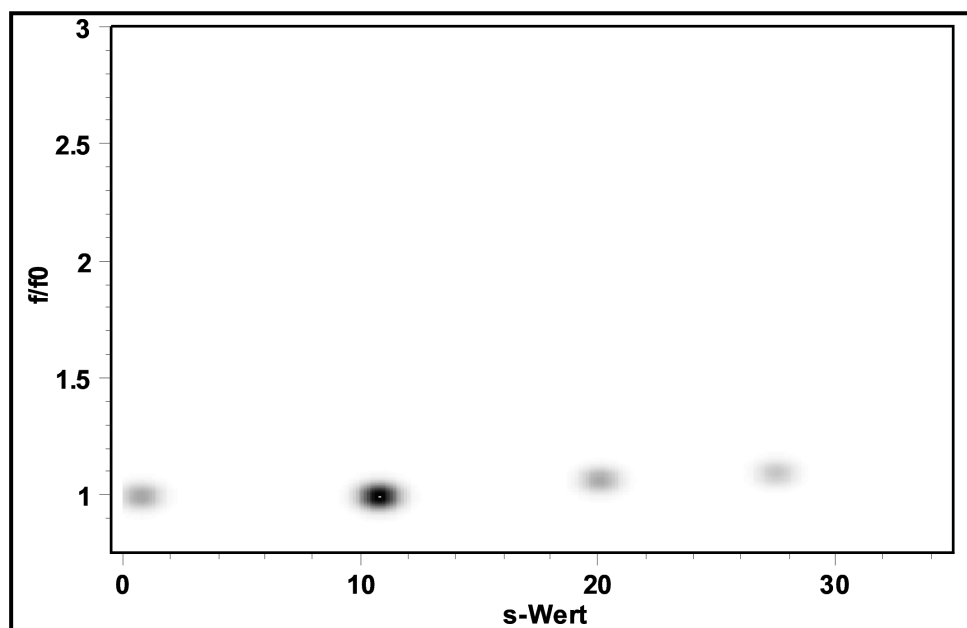


Abb. 5.24.b Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{S210A} mittels Monte Carlo Analyse

Tab. 5.6.a Verteilung der oligomeren Zustände von DegP_{S210A} ohne Aktivator

s-Wert	Oligomer	Anteil [%]
10,9	Hexamer	64
20,6	Dodecamer	23
27,5	24mer	13

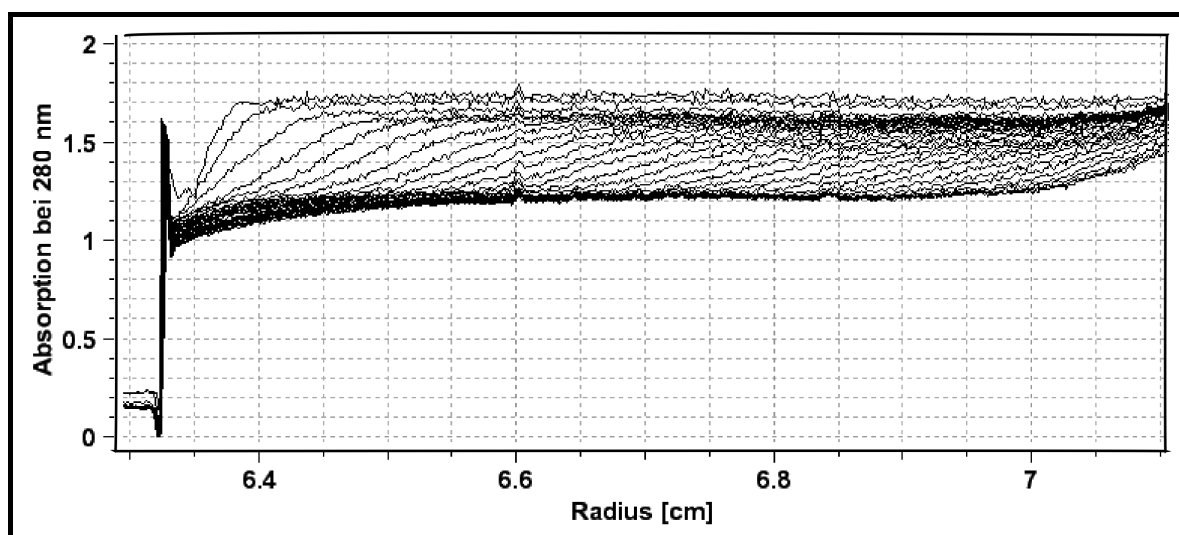


Abb. 5.24.c Rohdaten der AUZ von DegP_{S210A} mit verdautem β -Casein

50 μ M DegP_{S210A} wurden mit 40 μ g β -Casein in der analytischen Ultrazentrifugation bei 30°C untersucht und ihre Sedimentation bei einer Absorption von 280 nm gemessen.

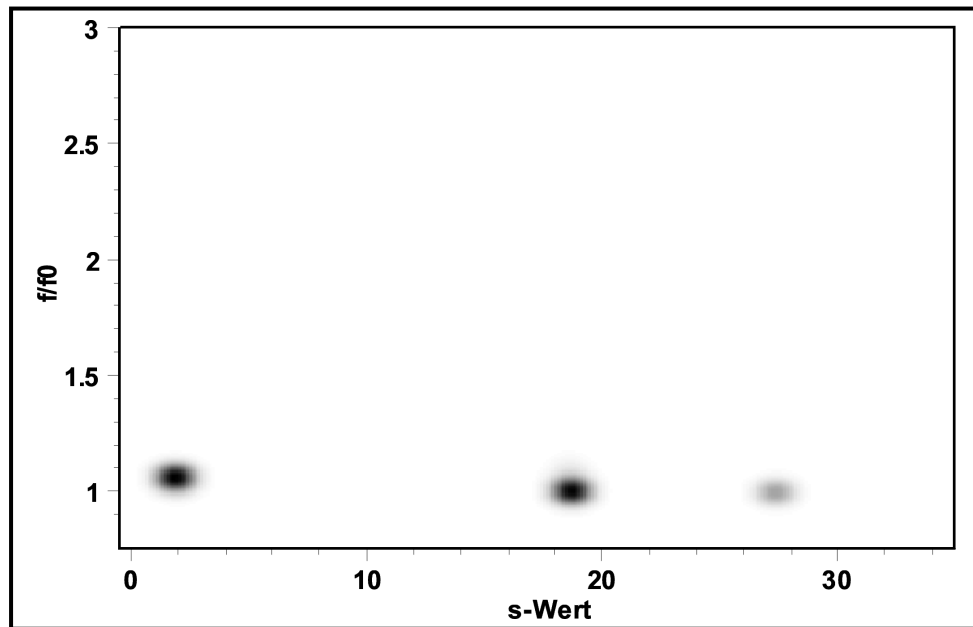


Abb. 5.24.d Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{S210A} mit verdautem β -Casein mittels Monte Carlo Analyse

Tab. 5.6.b Verteilung der oligomeren Zustände von DegP_{S210A} mit verdautem β -Casein

s-Wert	Oligomer	Anteil [%]
10,5	Hexamer	2
19,4	Dodecamer	76
27,6	24mer	21

5.9. Die hocholigomeren Zustände von DegP zeigen hohe Proteaseaktivitäten

Wie unter 5.8. *Analysen des oligomeren Zustandes von DegP* gezeigt, verändert sich der Oligomerisierungszustand von DegP durch Zugabe von aktivierenden Peptiden in Form von verdautem β -Casein. Des weiteren konnte unter 5.7.4.2. *Allosterische Aktivierung von DegP durch Proteolysefragmente von β -Casein* gezeigt werden, dass die Proteaseaktivität von DegP durch verdautes β -Casein allosterisch aktiviert werden kann. Hierdurch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Bindung des verdauten β -Caseins zu den höheren Oligomeren führt und diese die proteolytisch aktivierte Form von DegP darstellen. Um dies zu beweisen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Eine präparative Gelfiltration mit 10 mg DegP und

0,5 mg verdautem β -Casein wurde durchgeführt und Fraktionen des 24mers, Dodecamers und Hexamers gesammelt (Abb. 5.25. und Tab. 5.7.).

Im Anschluss wurden die Proteinproben aufkonzentriert, die Konzentration bestimmt und ein pNA Enzymassay unter Standardbedingungen ohne Zugabe von weiteren Aktivatorpeptiden durchgeführt und ausgewertet (Tab. 5.8.). Die spezifischen Aktivitäten der beiden hocholigomeren Zustände lagen beide im Bereich von etwa $350 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und damit um einen Faktor von ca. 30 höher als die spezifische Aktivität des Hexamers. Die ermittelte Aktivität des Hexamers lag mit $13 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in einem Bereich, der in früheren Versuchen für DegP unter den Enzymtestbedingungen mit SPMFKGV-pNA ohne Aktivator bestimmt werden konnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die bestimmte allosterische Aktivierung von DegP zu höheren DegP Oligomeren führt, welche die proteolytisch aktivierte Formen von DegP darstellen.

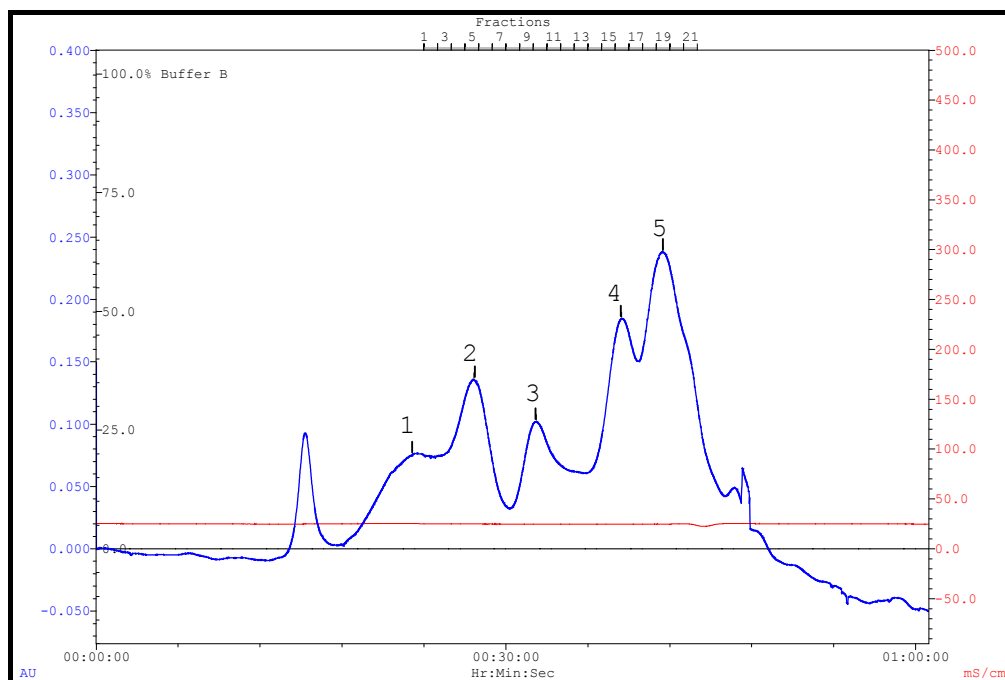


Abb. 5.25. Präparative Gelfiltration von DegP mit verdautem β -Casein

10 mg DegP wurden mit 0,5 mg verdautem β -Casein bei 37°C für 10 min vorinkubiert und anschließend mittels Gelfiltration auf den Oligomerisierungszustand untersucht. Der Durchfluss wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die jeweiligen Fraktionen eines Peaks wurden vereinigt und konzentriert.

Tab. 5.7. Oligomerer Zustand der vereinigten Fraktionen aus jeweils einem Peak

Peak	MW (kDa)	Oligomer/Zusatz
1	1182	24,6
2	583	12,1
3	261	5,4
4	155,8	3,2
5	89	verd. β -Casein

Tab. 5.8. Spezifische Aktivität der unterschiedlichen Oligomere von DegP

1 μ M DegP wurde im Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8) mit 0,5 mM des SPMFKGV-pNA Substrates inkubiert. ΔA_{405} wurde für 1 h bei 37°C bestimmt und die spezifische Aktivität berechnet. Die Standardabweichung betrug < 20%.

	Peak 1 24mer DegP	Peak 2 Dodecamer DegP	Peak 3 Hexamer DegP	Peak 4 Trimer DegP	Peak 5 verd. β -Casein
Spez. Aktivität [nmol * mg^{-1} * min^{-1}]	387	327	13	0	0

5.10. Mutationsanalyse des LA Loops von DegP

Die Kristallstruktur des DegP Hexamers wurde durch Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2002) gelöst. Ein Hexamer wird von zwei Trimeren gebildet. Die Verknüpfung dieser beiden Trimere erfolgt im Inneren des Partikels über die sogenannte Loop Triade. Diese Loop Triade wird aus dem LA Loop eines Monomers des einen Trimers und den Loops L1 und L2 eines Monomers des gegenüberliegenden Trimers gebildet. In dieser Konformation hat diese Loop Triade zwei wichtige Funktionen. Zum einen stabilisiert sie das beschriebene Hexamer und zum anderen blockiert die Loop Triade den Zugang zum aktiven Zentrum. Hierdurch liegt DegP in einem inaktiven Zustand vor. Erst durch die Auflösung der Loop Triade und den daraus resultierenden weiteren Konformationsänderungen innerhalb jedes Monomers und deren Zusammenspiel wird das aktive Zentrum zugänglich und die katalytische Triade, das Oxyanion Loch und die Substratspezifitätstasche korrekt ausgebildet. Aufgrund von Kristallstrukturanalysen konnten unter anderem drei Aminosäuren bestimmt werden, die wahrscheinlich essentiell für die Interaktion des LA Loops mit dem L2 Loop sind. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuren Asparagin an

Position 45 (N45) und Glutamin an Position 47 (Q47) und 48 (Q48). Von diesen Aminosäuren wurden sowohl Einzel- (DegP_{N45F}), Doppel- (DegP_{N45F,Q47F}) und Dreifachmutanten (DegP_{N45F,Q47F,Q48F}), wie auch die proteolytisch inaktiven Varianten dieser Mutanten durch Austausch von Serin 210 durch Alanin kloniert. Alle Punktmutanten wurden wie unter 5.2. *Reinigung von DegP und DegP-Derivaten* erörtert gereinigt und in den weiteren Versuchen getestet.

5.10.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität der LA Loop Mutanten im pNA Enzymtest

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität der LA Loop Mutanten wurden die Mutanten DegP_{N45F}, DegP_{N45F,Q47F} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F} im pNA Enzymassay getestet. Unter nicht aktivierenden Bedingungen wurden das SPMFKGV- und das DPMFKLV-pNA als Substrat untersucht (Tab. 5.9.). Hierbei fiel auf, dass die Mutanten im Vergleich zum Wildtypen eine deutlich erhöhte spezifische Aktivität mit dem SPMFKGV-pNA Substrat aufwiesen. So zeigte die Einfachmutante eine 2fach, die Zweifachmutante eine 2,6fach und die Dreifachmutante eine 4fach höhere spezifische Aktivität.

Im Enzymtest mit dem DPMFKLV-pNA konnte bei den drei Mutanten keine signifikante Abweichung festgestellt werden, obwohl alle drei eine leicht erniedrigte spezifische Aktivität zeigten (zwischen 10 bis 20% niedrigere Aktivität als beim Wildtypen).

Tab. 5.9. Spezifische Aktivität der LA Loop Mutanten

Für die Enzymtests mit dem SPMFKGV-pNA wurde 1 µM DegP mit 0,5 mM des pNA inkubiert, ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt und hieraus die spezifische Aktivität berechnet. Der Enzymtest mit dem DPMFKLV-pNA erfolgte unter den gleichen Bedingungen, außer dass 0,1 µM DegP eingesetzt wurde.

Mutante	spez. Aktivität [nmol * mg ⁻¹ * min ⁻¹]	
	SPMFKGV-pNA	DPMFKLV-pNA
Wildtyp	17	472
DegP _{N45F}	34	395
DegP _{N45F,Q47F}	45	413
DegP _{N45F,Q47F,Q48F}	67	422

5.10.2. Abbau von Vollängenproteinen

5.10.2.1. Zymogramm von LA Loop Mutanten im Vergleich zum Wildtypen

Die LA-Loop Mutanten wurden auf ihre Fähigkeit, Vollängenproteine proteolytisch zu spalten, untersucht. Hierfür wurden Zymogramm-Gele mit Casein als gelgebundenes Substrat benutzt. Als Negativkontrolle diente die proteolytisch inaktive DegP_{S210A} Mutante, als Positivkontrolle diente der Wildtyp, dessen vollständiger Caseinabbau, mit dem Symbol „+++“ bezeichnet wurde. Leicht reduzierter Caseinabbau wurde mit „++“, geringer Caseinabbau mit „+“ und kein Caseinabbau mit „-“ gekennzeichnet. Für die Punktmutanten im LA Loop wurde ein leicht reduzierter Caseinabbau im Vergleich zum Wildtypen bestimmt (Tab. 5.10.). Diese Reduktion kann aber vielleicht auch damit begründet werden, dass auch im SDS-Gel der bereits bei der Reinigung bestimmte stärkere Eigenabbau von allen drei Punktmutanten detektiert werden konnte. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass die Punktmutanten im LA Loop die prinzipielle Fähigkeit, Casein proteolytisch abzubauen, erhalten haben.

Tab. 5.10. Ergebnisse der Zymogramm-Gele von Wildtyp und LA Loop Mutanten

Die zu testenden Proteine (je 10 µg) wurden auf ein nicht denaturierendes Zymogramm-Gel aufgetragen, das Casein enthielt. Nach der Entwicklung wurde das Gel Coomassie Blau gefärbt. Der Caseinabbau wurde semiquantitativ ausgewertet. - kein Caseinabbau; + geringer Caseinabbau im Vergleich zum Wildtypen; ++ leicht reduzierter Caseinabbau im Vergleich zum Wildtypen; +++ wildtypischer Caseinabbau

Mutante	Caseinverdau im Zymogram
Wildtyp	+++
DegP _{N45F}	++
DegP _{N45F,Q47F}	++
DegP _{N45F,Q47F,Q48F}	++
DegP _{S210A}	-

5.10.2.2. β -Caseinabbau durch die LA Loop Mutanten im Vergleich zum Wildtypen

Als Protein ohne viele Sekundärstrukturen kann β -Casein als Modells substrat für DegP, welches nur mindestens partiell ungefaltete Proteine proteolysiert, benutzt werden. Ähnlich wie MaIS kann der Abbau von β -Casein durch DegP auf einem SDS-Gel analysiert und semiquantitativ ausgewertet werden. Infolgedessen wurden die Mutanten im LA Loop auch im β -Casein Verdau getestet. Als Positivkontrolle diente erneut der Wildtyp (Abb. 5.26.). Dieser konnte in den eingesetzten Konzentrationen das β -Casein nach 15 bis 18 min vollständig abbauen. Die drei Punktmutanten im LA Loop zeigten nur einen geringfügig langsameren β -Caseinabbau, was zeigt, dass die Grundfunktion, Vollängenproteine abzubauen, prinzipiell erhalten geblieben ist.

5.10.3. In vivo Komplementatin der Hitzesensibilität eines *degP*-Stammes durch DegP-Derivate im LA Loop

Die Funktion von wildtypischem DegP und den Punktmutanten im LA Loop kann *in vivo* über die Komplementation eines *degP*-Phänotyps untersucht werden.

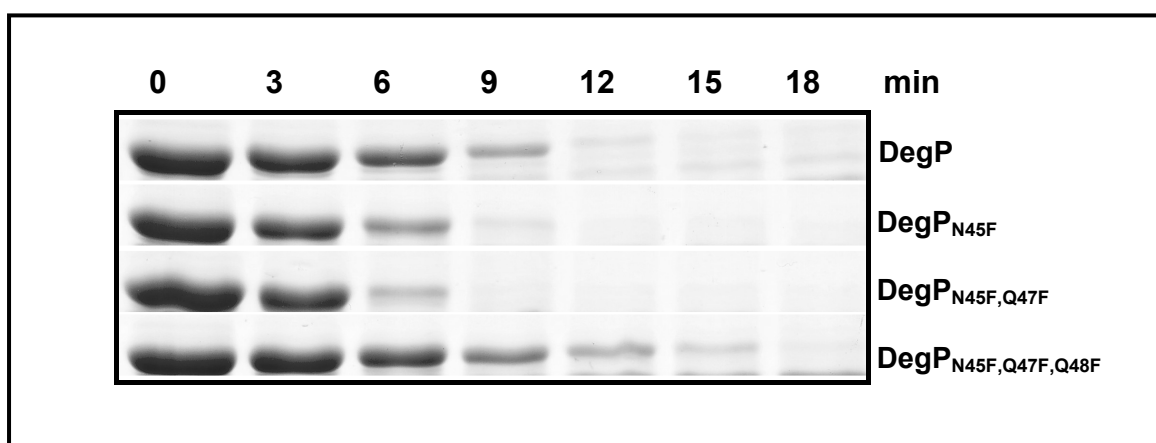


Abb. 5.26. Zeitaufgelöster β -Casein Verdau durch DegP und DegP-Derivate

1 μ M DegP bzw. DegP-Derivaten wurde mit 20 μ M β -Casein in 50 mM NaH_2PO_4 pH 8 bei 37°C inkubiert und SDS-Gelproben im Abstand von 3 min entnommen. Der Nachweis erfolgte mittels SDS-Gel und anschließender Coomassie-Blau Färbung. Der Abbau des β -Caseins durch DegP und die DegP-Derivate wurde vergleichend untereinander aufgetragen.

Der Test erfolgte, indem ein *degP*⁻-Stamm, der die verschiedenen *degP*-Konstrukte von den jeweiligen Plasmiden exprimiert, über Nacht angezogen und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt wurde. Hiervon wurden 1:10 Verdünnungen bis 10⁻⁷ angelegt und je 2 µl der entsprechenden Verdünnung auf NZA-Agarplatten mit IPTG in Konzentrationen von 1 µM aufgetropft. Die Inkubation erfolgt für 16 h bei 43°C.

Hierbei zeigte sich die Verdünnung von 10⁻² als optimal für die Auswertung. Der Stamm DHB4 diente als Positivkontrolle, als Negativkontrolle diente der Leervektor pCS19 im DegP⁻ Stamm KU98.

Sowohl der Wildtyp, als auch die drei Punktmutanten im LA Loop zeigten eine nur leicht verringerte *in vivo* Komplementation im Vergleich zur Positivkontrolle (Tab. 5.11. und Abb. 5.27.). Die DegP_{S210A} Mutante wies, wie bereits durch Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) bestimmt, nur kleine Einzelkolonien auf, was zeigt, dass bei Temperaturen über 42°C die Proteasefunktion von DegP überwiegt. Diese *in vivo* Proteasefunktion von DegP ist nach den Daten der Komplementation auch bei den LA Loop Mutanten erhalten.

Tab. 5.11. Komplementationstest der Hitzesensibilität

2 µl einer 0,001 OD Flüssigkultur des jeweiligen Stammes ohne bzw. mit entsprechendem Plasmid wurde auf NZA-Platten mit 1 µM IPTG ausplattiert und 16 h bei 43°C inkubiert. Das Wachstum wurde analysiert. - kein Wachstum; + kleine Einzelkolonien; ++ leicht verringerte Komplementation im Vergleich zu DHB4; +++ vollständige Komplementation im Vergleich zu DHB4

Plasmid/Stamm	Mutante	Komplementation
pCS20	DegP	++
pAB31	DegP _{N45F}	++
pAB32	DegP _{N45F,Q47F}	++
pAB33	DegP _{N45F,Q47F,Q48F}	++
pCS21	DegP _{S210A}	+
pCS19	-	-
DHB4	-	+++



Abb. 5.27. Komplementation der Hitzesensibilität im Vergleich

Wachstumskontrolle der Stämme DHB4 als Positivkontrolle (+++ vollständiges Wachstum), KU98/pCS20 (++ leicht verringerte Komplementation im Vergleich zu DHB4), KU98/pCS21 (+ kleine Einzelkolonien) und KU98/pCS19 als Negativkontrolle (- kein Wachstum).

5.10.4. Aktivierung der LA Loop Mutanten im pNA-Enzymtest

Für das wildtypische DegP konnte in dieser Arbeit eine allosterische Aktivierung gezeigt werden. Durch die Inkubation sowohl mit kleinen Peptiden wie dem DNRLGLVYFF Peptid oder den Proteolysefragmenten von Kompletต์verdaus von β -Casein, als auch von Vollängenproteinen konnte die enzymatische Aktivität von DegP erhöht werden. Der Einfluss dieser Aktivatoren wurde im pNA Enzymtest ebenfalls für die Punktmutanten DegP_{N45F}, DegP_{N45F,Q47F} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F} untersucht (Tab. 5.12.). Für den Wildtyp wurde eine Aktivierung je nach eingesetztem Substrat und Aktivator von 1,7 bis 8,0 detektiert. Die drei Punktmutanten im LA Loop zeigen mit keinem dieser Aktivatoren eine signifikante Erhöhung der spezifischen Aktivität.

Tab. 5.12. Bestimmung der Aktivierung der LA Loop Mutanten im pNA-Enzymtest

Für die Enzymtests wurde 1 μ M (für den Test mit SPMFKGV-pNA) bzw. 0,1 μ M (für den Test mit DPMFKLV-pNA) DegP mit 50 μ M DNRLGLVYFF; 3 μ M (entspricht 5 μ g) β -Casein bzw. 5 μ g verdaulichem β -Casein vorinkubiert. 0,5 mM des pNA wurde dem Reaktionsansatz im Puffer mit 50 mM NaH₂PO₄ pH 8 zugegeben, ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt und die spezifische Aktivität berechnet. Die Aktivität wurde jeweils auf die Proteinprobe ohne Aktivator normiert. Die Standardabweichung betrug < 20%.

Mutante	DNRLGLVYFF	xfache Aktivierung [Normiert]		DPMFKLV-pNA + verd. β -Casein
		SPMFKGV-pNA + β -Casein	verd. β -Casein	
DegP	1,7	3,0	8,0	2,4
DegP _{N45F}	0,8	1,1	1,1	1,0
DegP _{N45F,Q47F}	1,0	1,1	1,1	1,1
DegP _{N45F,Q47F,Q48F}	0,9	0,9	1,0	1,1

5.10.5. Oligomerisierung der LA Loop Mutanten

Da die LA-Loop Mutanten DegP_{N45F}, DegP_{N45F,Q47F} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F} im pNA Enzymtest eine erhöhte Aktivität zeigten, sich in den Vollängenproteinabbau und in der *in vivo* Komplementation nahezu wie der Wildtyp verhielten, jedoch durch Zugabe von Aktivatoren nicht aktivieren ließen, wurde der oligomere Zustand der Proteine untersucht. Hierfür wurden die Methoden des Cross-Links und der analytischen Ultrazentrifugation genutzt.

5.10.5.1. Analyse der Oligomerisierung der LA Loop Mutanten mittels Cross-Link

Die drei LA Loop Mutanten sollten auf ihren oligomeren Zustand hin analysiert werden. Hierfür wurde erneut die Methode des Cross-Links benutzt. Da die Mutanten eine starke Autoproteolyse bei der Reinigung gezeigt hatten und diese im Cross-Link Versuch zu einem starkem Hintergrund führt, wurden die proteolytisch inaktiven Varianten genutzt. Für den Wildtyp konnte gezeigt werden, dass dieser Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Oligomerisierung der Proteine hat.

Die Mutanten DegP_{N45F,S210A}, DegP_{N45F,Q47F,S210A} und DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A}, sowie DegP_{S210A} als Kontrolle wurden im Cross-Link Versuch allein, mit β -Casein und Proteolysefragmenten von Komplettverdaus von β -Casein durch DegP eingesetzt und der oligomere Zustand bestimmt (Abb. 5.28.). Im Vergleich zum wildtypischen DegP, welches ohne Aktivator hauptsächlich als Hexamer vorliegt, zeigen die LA Loop Mutanten bereits ohne Aktivator einen erhöhten Anteil an hocholigomeren Zuständen, insbesondere an Dodecamer und 24mer. Diese Tendenz zu höheren Oligomeren verstärkt sich mit Zunahme der Anzahl an Punktmutationen im LA Loop bis zur Dreifachmutante, die weniger als 10% Hexamer im nicht aktivierten Zustand aufweist. Somit führt die Zugabe von Aktivator auch nur zu einer geringen Veränderung der oligomeren Zustände der Mutanten im Vergleich zu DegP_{S210A}.

5.10.5.2. Analyse der Oligomerisierung der LA Loop Mutanten mittels analytischer Ultrazentrifugation

Zur Bestätigung der Ergebnisse von 5.10.5.1. *Analyse der Oligomerisierung der LA Loop Mutanten mittels Cross-Link* wurde mit der Mutante DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} eine AUZ-Analyse durchgeführt. Auch hier wurde ein AUZ-Lauf ohne Aktivator und einer mit 40 μ g verdautem β -Casein als Aktivator durchgeführt. Die Auswertung erfolgte, wie unter 4.3.5.3. *Analytische Ultrazentrifugation* ausführlich erörtert, mittels Monte Carlo Analyse (Abb. 5.29.a/b und Tab. 5.13a/b).

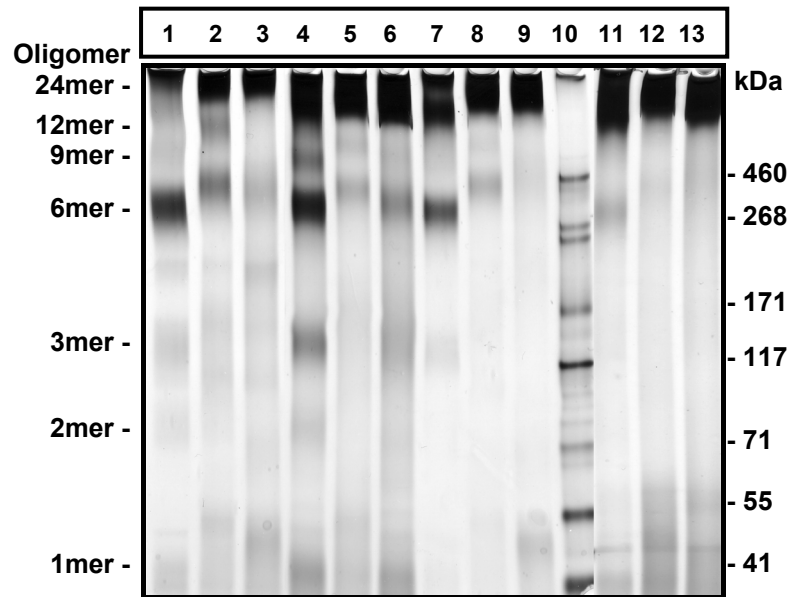


Abb. 5.28. Cross-Link von LA Loop Mutanten mit und ohne Aktivator

2 μM von DegP und seinen LA Loop Mutanten wurde ohne, mit 5 μM β -Casein oder 5 μg verdautem β -Casein im Reaktionspuffer für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Cross-Linkers Glutaraldehyd (0,1% (v/v)). Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Stopplösung (1:10) nach 2 min unterbrochen und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 40°C für 10 min und eine elektrophoretische Auftrennung der Proben mittels NuPAGE Novex Midi Gel (Invitrogen). Im Anschluss erfolgte eine Silberfärbung. 1.) DegP_{S210A}; 2.) DegP_{S210A} mit 5 μM β -Casein; 3.) DegP_{S210A} mit 5 μg verdautem β -Casein; 4.) DegP_{N45F,S210A}; 5.) DegP_{N45F,S210A} mit 5 μM β -Casein; 6.) DegP_{N45F,S210A} mit 5 μg verdautem β -Casein; 7.) DegP_{N45F,Q47F,S210A}; 8.) DegP_{N45F,Q47F,S210A} mit 5 μM β -Casein; 9.) DegP_{N45F,Q47F,S210A} mit 5 μg verdautem β -Casein; 10.) NuPAGE Novex Proteinmarker; 11.) DegP_{N45F,Q47F,Q48FS210A}; 12.) DegP_{N45F,Q47F,Q48FS210A} mit 5 μM β -Casein; 13.) DegP_{N45F,Q47F,Q48FS210A} mit 5 μg verdautem β -Casein

Wie bei den Cross-Link Experimenten konnte auch hier bereits ohne die Zugabe von Aktivator ein stark erhöhter Anteil an Dodecamer und 24mer bestimmt werden. Werden die Verunreinigungen der Probe, in der vorliegenden Auswertung mit einem s-Wert von etwa 3,9, abgezogen, so ergibt sich eine Verteilung der oligomeren Zustände von DegP von 2% Hexamer (10,5 s), 82% Dodecamer und 16% 24mer. Im Vergleich hierzu wurde unter gleichen Bedingungen für DegP_{S210A} eine Verteilung für Hexamere von 64%, für Dodecamere von 23% und für 24mere von 13% bestimmt. Durch die Zugabe von verdautem β -Casein konnte beim wildtypischen DegP eine Erhöhung der Anteile der hocholigomeren Zustände erreicht werden. Die oligomeren Zustände verteilten sich auf 2% Hexamere, 76% Dodecamere und 21% 24mere. Bei der hier zu testenden DegP Mutante DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} konnte durch die gleiche Zugabe kein signifikanter Anstieg der Dodecamere (80%) und 24mere (20%) bestimmt werden.

Damit konnten durch die analytische Ultrazentrifugation die Ergebnisse der Cross-Link Methode bestätigt, was zeigt, dass die eingefügten Punktmutationen innerhalb des LA Loops zu einer klaren Verschiebung der Oligomerisierung von DegP zu den hocholigomeren Formen führen.

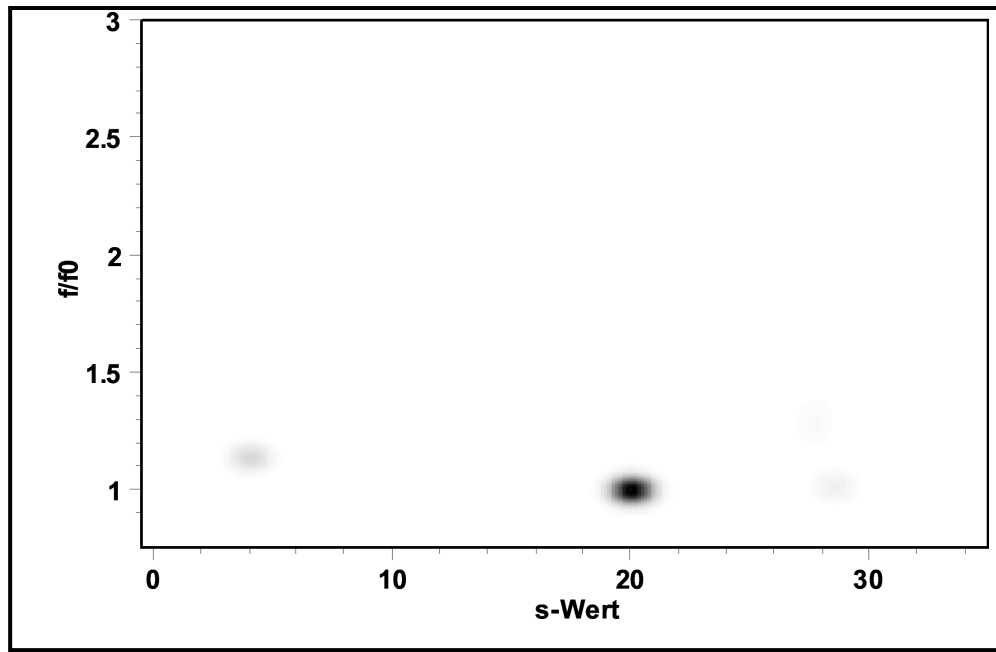


Abb. 5.29.a Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} mittels Monte Carlo Analyse

50 μ M von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} wurden in der analytischen Ultrazentrifugation bei 30°C untersucht und mittels Monte Carlo Analyse ausgewertet.

Tab. 5.13.a Verteilung der oligomeren Zustände von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} ohne Aktivator

S-Wert	Oligomer	Anteil [%]
10,5	Hexamer	2
20,2	Dodecamer	82
29,0	24mer	16

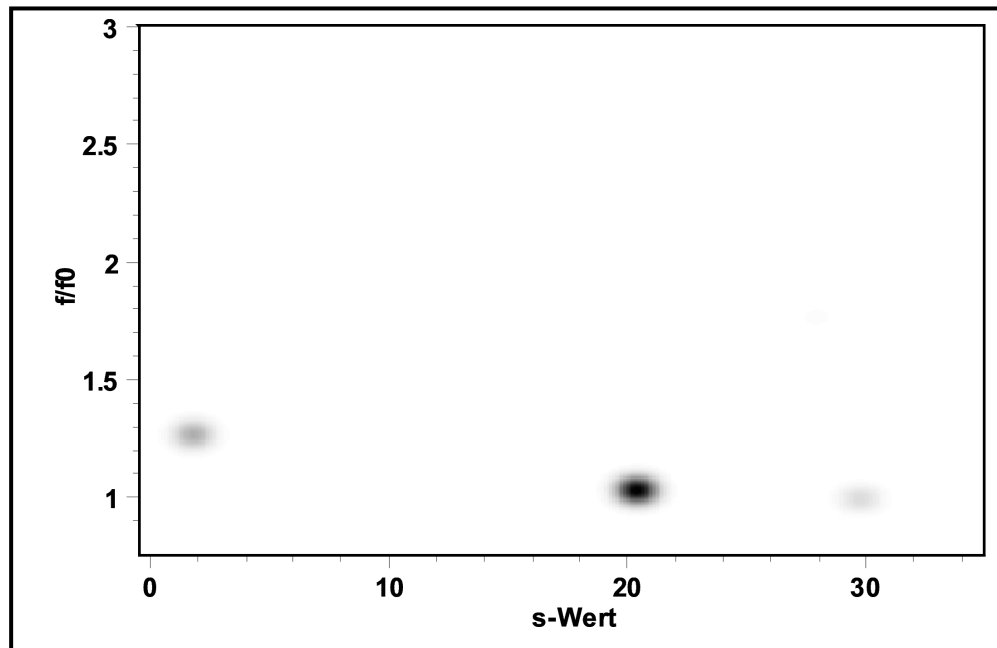


Abb. 5.29.b Auswertung des AUZ-Laufs von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} mit verdautem β -Casein mittels Monte Carlo Analyse

50 μ M von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} wurden mit 40 μ g β -Casein in der analytischen Ultrazentrifugation bei 30°C untersucht und mittels Monte Carlo Analyse ausgewertet.

Tab. 5.13.b Verteilung der oligomeren Zustände von DegP_{N45F,Q47F,Q48F,S210A} mit verdautem β -Casein

S-Wert	Oligomer	Anteil [%]
23,1	Dodecamer	80
30,9	24mer	20

5.11. RseA wird von DegP proteolytisch abgebaut

E. coli reagiert auf fehl- und ungefaltete Außenmembranproteine im Periplasma durch eine Induktion der σ^E -abhängigen Transkription von Stressgenen im Cytoplasma. Dieser Prozess benötigt eine proteolytische Kaskade, welche durch die Proteolyse eines Transmembranproteins, des Antisigmafaktors für σ^E RseA durch DegS, eingeleitet wird (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001; Alba *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003). DegS führt dabei einen einzigen spezifischen Schnitt innerhalb von RseA durch. Dieser Schnitt erfolgt zwischen dem Valin an der Position 148 (V₁₄₈) und dem Serin an der Position 149 (S₁₄₉). Im weiteren wird der N-Terminus ins Cytoplasma entlassen und dort degradiert. Der C-Terminus wird ins Periplasma

entlassen. Die Degradation dieses RseA Fragments ist nicht geklärt. Da RseA insgesamt wenig Sekundärstrukturen aufweist und die periplasmatische Protease DegP bevorzugt ungefaltete Proteine proteolytisch angreift, wurde untersucht, ob RseA ein Substrat für DegP ist.

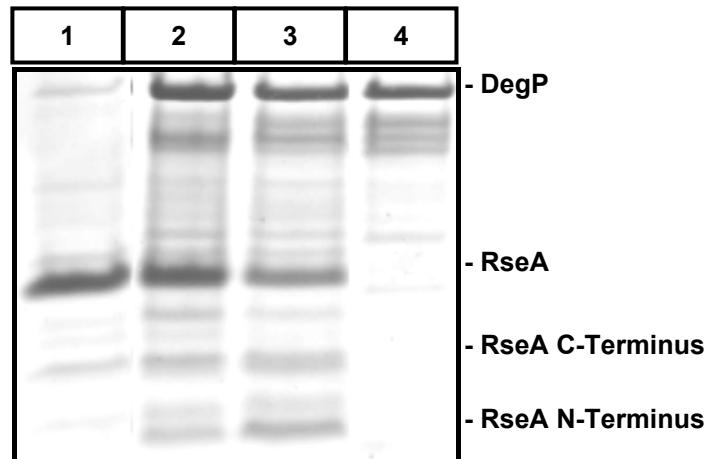


Abb. 5.30. Zeitaufgelöster RseA Verdau durch DegP

10 μM RseA wurde mit 1 μM DegP in 50 mM NaH_2PO_4 pH 8 bei 37°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte vor der Inkubation und nach 15, 30 und 60 min. Anschließend erfolgte der Nachweis mittels Tris-Tricin Gel und Coomassie-Blau Färbung. 1.) RseA; 2.) DegP mit RseA 15 min; 3.) DegP mit RseA 30 min; 4.) DegP mit RseA 60 min

5.11.1. Verdau von RseA durch DegP

Um die Hypothese zu unterstützen, dass RseA, insbesondere der nach dem DegS Verdau freiwerdende periplasmatische C-Terminus, ein potentiell Substrat für DegP sein könnte, wurde gereinigtes DegP mit RseA in einem Reaktionsansatz inkubiert¹. Die zeitaufgelöste Analyse der Proteolyse erfolgte mittels Tris-Tricin Gelen, um die elektrophoretische Auftrennung der kleineren Fragmente auflösen zu können.

Die Analyse des Verdaus von RseA zeigte, dass RseA *in vitro* ein Substrat für DegP ist. Hierbei ist zu erkennen, dass durch einen ersten proteolytischen Schritt von DegP zwei distinkte Produkte von RseA entstehen.

¹ RseA wurde von Dr. Hasenbein gereinigt.

Durch längere Inkubation werden erst das Volllängenprotein RseA und dann die entstandenen beiden Fragmente vollständig abgebaut, wobei der Abbau des größeren Fragments zeitlich schneller erfolgt. Insbesondere der erste proteolytische Schnitt von DegP bei RseA ist ein interessanter Befund, da hierbei zwei definierte Fragmente mit einem Molekulargewicht > 1 kDa (Auftrennungsgrenze des Gels) detektiert werden konnten. Wie durch die anderen Substrate Casein und MalS in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, findet durch DegP normalerweise ein vollständiger Verdau zu kleinen Produkten unter 1 kDa statt. Zur Analyse der entstandenen zwei Proteolysefragmente von RseA wurde eine Massenbestimmung mittels Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) des Verdau durchgeführt.

5.11.2. Bestimmung der DegP Schnittstelle innerhalb von RseA mittels Elektrospray-Ionisationsmethode

Zur genauen Bestimmung der Schnittstelle von DegP innerhalb der RseA Sequenz wurde eine Elektrospray-Ionisation (ESI) durchgeführt¹. Hierfür wurde 1 μ M DegP mit 10 μ M RseA in NaH_2PO_4 pH 8 bei 37°C inkubiert und die Reaktion nach 30 min durch Überführung auf Eis gestoppt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass sowohl Volllängenprotein RseA, als auch die beiden zu analysierenden Fragmente in ausreichenden Mengen im Reaktionsansatz detektierbar waren.

Die Massenbestimmung erfolgte wie unter 4.3.6. *Massenbestimmung mittels Elektrospray-Ionisationsmethode* beschrieben. Es konnte ein auswertbares Spektrum von 3.000 bis 14.000 Da aufgenommen werden (Abb. 5.31.a), in dem ein Peak mit einem berechneten Molekulargewicht von 13.179,1 Da überwiegt. Dieser Peak konnte dem Volllängenprotein RseA mit einem Molekulargewicht von 13.310,6 Da zugeordnet werden.

Im weiteren wurden Detailausschnitte im Bereich von 4.700 bis 5.700 Da und im Bereich von 7.800 bis 8.100 Da analysiert (Abb. 5.31.b und Abb. 5.31.c). Hierdurch konnten zwei weitere große Peaks detektiert werden, die einem Molekulargewicht von 5.204,4 bzw. 7.985,0 Da entsprechen.

¹ Die ESI Messungen wurden in Kooperation im Chemical-Genomics-Centre (CGC) in Dortmund durchgeführt.

Aufgrund dieser berechneten Molekulargewichte konnte die DegP Schnittstelle für RseA bestimmt werden, die somit zwischen der Position V₁₄₈ und S₁₄₉ liegen würde. Das genaue Molekulargewicht der dabei entstehenden Fragmente läge aufgrund der Aminosäurezusammensetzung bei 5.333,9 Da bzw. 7.994,7 Da, was einer Abweichung von etwa 2 bzw. < 1% entspricht.

Die somit bestimmte Schnittstelle entspricht der Schnittstelle von DegS für RseA. Das Fragment mit etwa 8 kDa wäre der im Periplasma freiwerdende C-Terminus und das etwa 5,3 kDa Fragment wäre der im Cytoplasma freiwerdende N-Terminus.

Die Ergebnisse des RseA Verdaus und der Massenbestimmung unterstützen zum einen die Hypothese, dass RseA ein *in vivo* Substrat von DegP sein könnte. Der periplasmatische Teil von RseA wird von DegP unter den oben genannten Versuchsbedingungen in weniger als 60 min vollständig abgebaut. Des weiteren konnte eine distinkte Proteolyse zwischen V₁₄₈ und S₁₄₉ bestimmt werden, die der Schnittstelle von DegS für RseA entspricht.

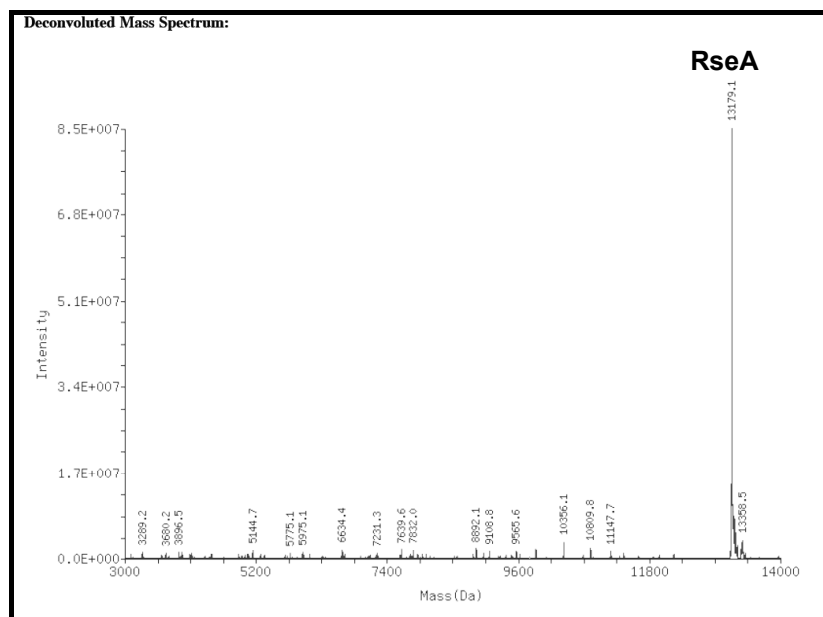


Abb. 5.31.a Übersicht des Massenspektrums des RseA Verdaus

1 μ M DegP wurde mit 10 μ M RseA in 50 mM NaH₂PO₄ pH 8 bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Massenbestimmung mittels ESI. Bei einer Masse von 13.179,1 Da konnte das unverdaute RseA detektiert werden.

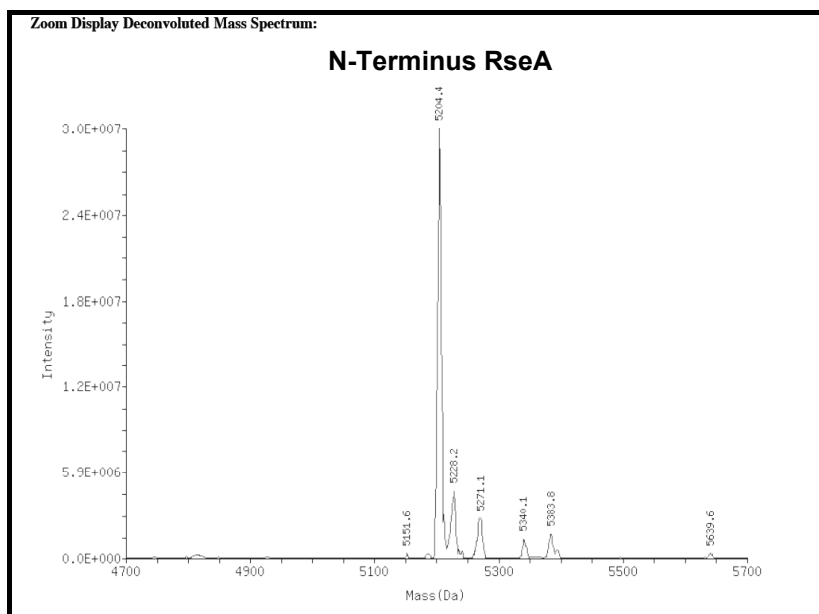


Abb. 5.31.b Detailausschnitt des Massenspektrums im Bereich von 4700-5700 Da

Im Detailausschnitt des Massenspektrums wurde mit 5.204,4 Da das N-terminale RseA-Fragment detektiert.

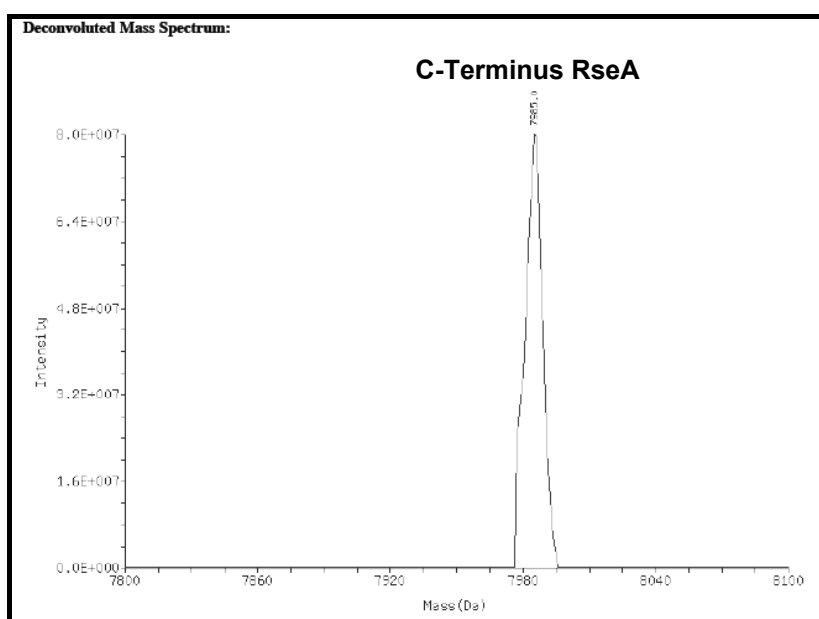


Abb. 5.31.c Detailausschnitt des Massenspektrums im Bereich von 7800-8100 Da

Im Detailausschnitt des Massenspektrums wurde mit 7.985,0 Da das C-terminale RseA-Fragment detektiert.

5.12. Substratspezifität von Serinproteasen

Nach der Entwicklung eines Enzymtests für DegP, sollte die Spezifität des entwickelten Substrats getestet werden. Mit einer hohen Spezifität des Substrates für das bakterielle DegP könnte ein gutes Nachweisverfahren von bakteriellem Befall in Säugergeweben entwickelt werden. Hierfür wurden die in Säugern vorkommenden Serinproteasen Elastase, Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, Kallikrein und die in *Bacillus subtilis* vorkommende Serinprotease Subtilisin mit dem DegP Substrat SPMFKGV-pNA getestet. Zusätzlich wurden alle pNA Substrate, die im Enzymtest mit DegP keine messbare spezifische Aktivität zeigten, für die oben genannten Serinproteasen getestet. Eine identische Versuchsreihe wurde mit dem Inhibitor Peptid SPMFKGV-CMK und den für DegP nicht wirksamen CMK Inhibitoren mit den Serinproteasen durchgeführt.

Für die Testreihen wurde neben dem aus eigener Reinigung stammenden DegP alle Enzyme von der Firma Sigma gekauft. Der Reaktionspuffer für die Enzymtests wurde für jede Serinprotease speziell angepasst, so dass jeweils optimale Reaktionsbedingungen vorlagen (Tab. 5.14.).

Tab. 5.14. Zu testende Serinproteasen und ihre Reaktionspuffer

Protease	Herkunft/Bestellnummer	Reaktionspuffer
Elastase	Sigma/E1250	100 mM Tris; pH 8
Plasmin	Sigma/P1867	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; 150 mM NaCl
Trypsin	Sigma/T0303	80 mM Tris; 20 mM CaCl ₂ ; pH 8
Chymotrypsin	Sigma/C4129	80 mM Tris; 20 mM CaCl ₂ ; pH 8
Thrombin	Sigma/T4648	50 mM NH ₄ HCO ₃
Kallikrein	Sigma/K2638	20 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,8
Subtilisin	Sigma/P5380	50 mM K ₂ HPO ₄ ; pH 8
DegP	Eigene Reinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 8

5.12.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität für die Serinproteasen

Die acht zu testenden Serinproteasen wurden im ersten Versuchsteil mit acht pNA Substraten aus der Laborsammlung getestet, darunter das entwickelte DegP

Substrat SPMFKGV-pNA. Zusätzlich wurde das Bz-R-pNA von Sigma getestet, welches für Trypsin und Kallikrein als Substrat bereits bekannt ist. Durch diese großflächige Substratsuche konnte jeweils mindestens ein Substrat pro Serinprotease bestimmt werden (Tab. 5.15.). Für Plasmin, welches eine hohe Spezifität für Lysin (K) und Arginin (R) an der Position P₁ aufweist (Robbins *et al.*, 1981), wurde für 2 Substrate eine spezifische Aktivität bestimmt. Beide Werte waren jedoch mit 2 bzw. 6 nmol * mg⁻¹ * min⁻¹ sehr niedrig. Trypsin und Thrombin zeigten nur mit dem Bz-R-pNA eine messbare Enzymaktivität. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die bestimmte spezifische Aktivität für Thrombin mit einem Wert von rund 3 nmol * mg⁻¹ * min⁻¹ sehr gering ist und an der unteren Auswertungsgrenze dieser Methode liegt. Für beide Serinproteasen konnte bestätigt werden, dass sie eine sehr hohe Spezifität für R an P₁ besitzen (Walsh, 1970; Backes *et al.*, 2000). Eine ähnliche Spezifität zu R, aber auch zu K an dieser Position zeichnet nach Heimark und Davie (Heimark und Davie, 1981) Kallikrein aus. Dies konnte durch die durchgeführten Messungen ebenfalls bestätigt werden, da nur das Bz-R-pNA als Substrat eine spezifische Aktivität aufwies. Chymotrypsin zeigte mit 2 Substraten aus der Laborsammlung eine messbare spezifische Aktivität, was die im Vergleich zum Trypsin geringere Spezifität von Chymotrypsin bestätigte (Rick, 1984; Nemoda und Sahin-Toth, 2006). Für die Serinproteasen Elastase und Subtilisin konnten gleich mehrere pNA Substrate als gut zu quantifizierend bestimmt werden. Für die Mammalia Protease Elastase ist ein breites Spektrum an Substraten bekannt. An der Position P₁ konnte eine Präferenz für ungeladene Aminosäuren festgestellt werden (Davril *et al.*, 1984; Jaspard, 2000; Ay *et al.*, 2003), die sich in den ermittelten spezifischen Aktivitäten wiederfinden lässt. Subtilisin von *B. subtilis* zeichnet eine erhöhte Präferenz für Alanin (A), aber auch eine geringe für Valin (V) und Glycin (G) an P₁ aus (Markland und Smith, 1971), die sich auch in dieser Reihenfolge in den Ergebnissen abzeichnet, da beide pNA Substrate mit A am C-Terminus mit Abstand die höchsten spezifischen Aktivitäten zeigen.

Tab. 5.15. Spezifische Aktivitäten der Serinproteasen mit unterschiedlichen pNA Substraten

5 µg Protein wurden jeweils mit 0,5 mM Substrat in dem zugehörigen Reaktionspuffer inkubiert und ΔA_{405} bei 37°C für 1 h bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde mit einer Standardabweichung < 15% berechnet.

Substrate (-pNA)	Elastase	Plasmin	spez. Aktivität [nmol * mg ⁻¹ * min ⁻¹]					
			Trypsin	Chymo-trypsin	Thrombin	Kallikrein	Subtilisin	DegP
SPMFKGV	7	0	0	0	0	0	3	18
SDAEFRHDSGYEV	8	0	0	0	0	0	2	0
STDGGV	5	2	0	0	0	0	0	0
SGRVVPGYGHA	56	0	0	0	0	0	2971	0
SPLPEGV	49	0	0	0	0	0	5	0
GLATGNVSTAELQDATPA	24	0	0	26	0	0	1521	0
KGKNSGSGATPV	74	0	0	5	0	0	34	0
KGKASVPGAGLV	6	0	0	0	0	0	0	0
Bz-R	0	6	758	0	3	24	0	0

Für DegP konnte, wie bereits unter 5.4.1. *Entwicklung eines synthetischen DegP Substrats* gezeigt, nur für das Substrat SPMFKGV-pNA eine spezifische Aktivität bestimmt werden. Elastase und Subtilisin wiesen ebenfalls eine messbare Aktivität mit diesem Substrat auf, wobei Elastase eine weniger als halb so hohe Aktivität und Subtilisin sogar nur 1/6 der Aktivität zeigte. Für beide Serinproteasen war das SPMFKGV-pNA auch nicht das beste Substrat. Für Elastase lag das beste Substrat SGRVVPGYGHA-pNA mit 74 nmol * mg⁻¹ * min⁻¹ um das 10fache und für Subtilisin SGRVVPGYGHA mit 2971 nmol * mg⁻¹ * min⁻¹ sogar um das knapp 1.000fache höher als das DegP Substrat. Somit konnte eine relativ gute Spezifität für das entwickelte DegP Substrat bestimmt werden. Zusätzlich konnten für Chymotrypsin, Elastase und insbesondere Subtilisin sehr gute neue pNA Substrate bestimmt werden.

5.12.2. Analyse der Inhibitoren für die Serinproteasen

Nachdem unter 5.12.1. *Bestimmung der spezifischen Aktivität für die Serinproteasen* die Substratspezifität bestimmt wurde, sollten im Folgenden die inhibitorischen CMK Peptide mit den Serinproteasen getestet werden.

Für DegP wurde bei der Inhibitorsuche das SPMFGV-CMK als ein guter Inhibitor detektiert, die weiteren fünf getesteten Inhibitoren zeigten nur eine unvollständige Inhibierung bei äquimolar eingesetzten Konzentrationen zum Substrat. Die sieben

Serinproteasen Elastase, Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, Kallikrein und Subtilisin wurden ebenfalls mit den insgesamt sechs Inhibitoren getestet (Tab. 5.16.b). Als Substrat diente jeweils das pNA, welches die höchste spezifische Aktivität im Enzymtest gezeigt hatte (Tab. 5.16.a).

Unter diesen Bedingungen konnte für Plasmin, Chymotrypsin, Thrombin und Kallikrein kein spezifischer Inhibitor ermittelt werden. Bei Trypsin wurde für die inhibitorischen Peptide ein vollkommen anderes Ergebnis ermittelt. Alle Peptide wirkten bis zu einem Faktor von sechs aktivierend auf Trypsin. Ein solcher Effekt wurde bereits von Radau und Rauh (Radau und Rauh, 1999) beschrieben. Strukturelle Begründungen hierfür konnten jedoch nicht gegeben werden.

Die Serinproteasen Elastase und Subtilisin wiesen wie bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität eine relativ geringe Spezifität auf. Die Präferenz für ungeladene Aminosäuren an P₁ für Elastase (Jaspard, 2000; Ay *et al.*, 2003) und die Präferenz für Valin an P₁ für Subtilisin (Markland und Smith, 1971) zeichneten sich erneut an den Ergebnissen ab. Elastase konnte von insgesamt vier der sechs Inhibitoren vollständig gehemmt werden. Subtilisin zeigte eine vollständige bzw. eine mehr als 95%ige Inhibierung mit zwei der Inhibitoren, weitere zwei inhibierten zu 85%. Bei beiden Serinproteasen gehörte das für DegP bestimmte SPMFKGV-CMK zu den Inhibitoren, die eine vollständige Inhibierung aufwiesen, weswegen auch der IC₅₀ Wert bestimmt wurde.

Tab. 5.16.a Substrate für die Inhibitorentests der Serinproteasen

Protease	Substrate (-pNA)
Elastase	KGKNSGSGATPV
Plasmin	Bz-R
Trypsin	Bz-R
Chymotrypsin	GLATGNVSTAELQDATPA
Thrombin	Bz-R
Kallikrein	Bz-R
Subtilisin	SGRVVPGYGHA
DegP	SPMFKGV

Tab. 5.16.b Inhibitoranalysen der Serinproteasen mit CMK Peptiden

Jeweils 5 µg Protein wurde mit 0,5 mM Inhibitor für 5 min bei 37°C vorinkubiert, danach erfolgte die Zugabe von 0,5 mM des jeweils besten pNA Substrats für die jeweilige Serinprotease (Tab. 5.16.a). Die Inhibierung wurde mittels ΔA_{405} Bestimmung bei 37°C für 1 h ermittelt. Die spezifischen Aktivitäten wurden berechnet und die prozentuale Restaktivität in Bezug zur Probe ohne Inhibitor bestimmt. Die Standardabweichung lag bei < 18%.

Inhibitor (-CMK)	Elastase	Plasmin	Trypsin	Restaktivität [%]		Kallikrein	Subtilisin	DegP
				Chymo-trypsin	Thrombin			
SPMFKGV	1	81	354	92	96	100	0	3
SGRVVPGYGHA	83	62	285	69	131	135	15	102
IWNTLN SGRVVP GTGHA	60	74	410	77	98	111	15	101
PVFNTLPMMGKASPV	0	62	591	48	101	122	142	63
VFNTLPMMGKASPV	0	75	288	22	102	88	154	57
PMMGKASPV	0	71	348	53	122	108	5	49

5.12.3. Bestimmung der IC_{50} Werte für das SPMFKGV-CMK bei Elastase und Subtilisin

Da das SPMFKGV-CMK sowohl für DegP als auch für Elastase und Subtilisin eine inhibitorische Wirkung zeigte, sollte wie für DegP auch für die beiden anderen Serinproteasen die Halbinhibierung (IC_{50}) bestimmt werden.

Hierfür wurden die Proteasen mit sinkenden Konzentrationsreihen des Inhibitors SPMFKGV-CMK inkubiert und die spezifischen Aktivitäten im pNA Enzymtest unter Standardbedingungen bestimmt (Abb. 5.32.a und Abb. 5.32.b).

Dabei zeigte das SPMFKGV-CMK für Elastase eine relativ schwache Inhibierung. Der IC_{50} konnte mit einem Wert von 220 µM bestimmt werden. Für Subtilisin konnte mit dem gleichen Inhibitor ein IC_{50} Wert von 1 nM bestimmt werden.

Unter 5.6. *Inhibierung der proteolytischen Aktivität von DegP* wurde für das inhibitorische SPMFKGV-CMK ein IC_{50} Wert von 75 µM für die Serinprotease DegP bestimmt. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass für die Mammalia Serinprotease Elastase eine 3fach schlechtere Inhibierung durch das CMK Peptid bestimmt werden konnte. Alle anderen getesteten Säugetierserinproteasen ließen sich gar nicht durch dieses Peptid inhibieren. Dies zeigt eine relativ gute Spezifität des DegP Inhibitors im Vergleich zu diesen Protease zeigt.

Die getestete Serinprotease von *B. subtilis*, Subtilisin, konnte extrem stark durch das CMK-Derivat inhibiert werden. Hier lag der IC_{50} Wert mit 1 nM etwa um das 75.000fache niedriger als bei DegP.

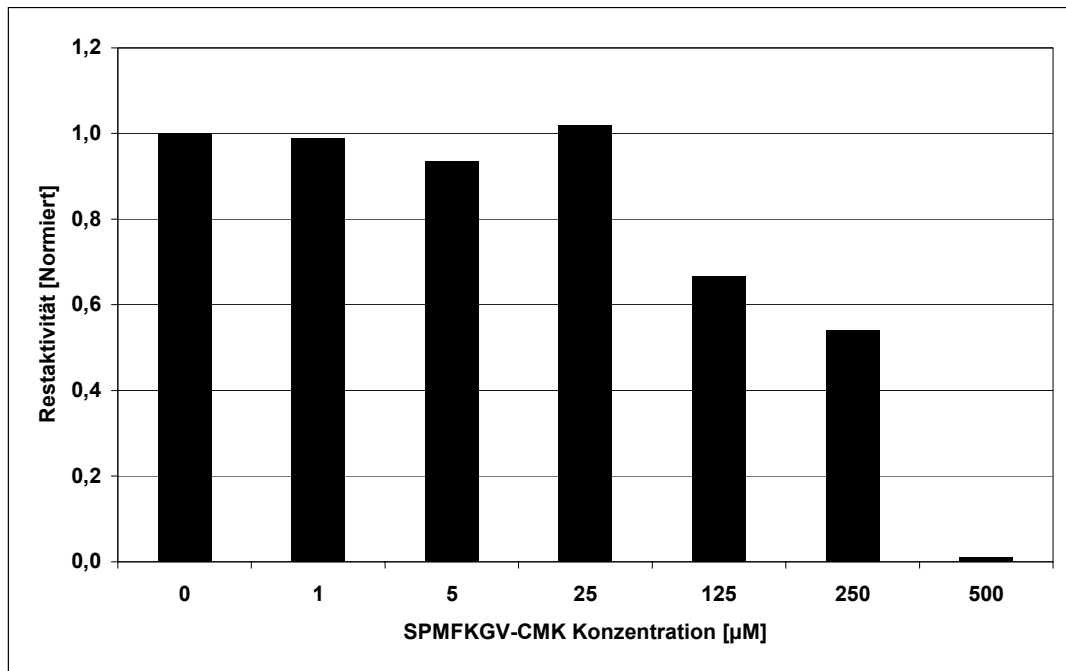


Abb. 5.32.a Bestimmung des IC_{50} von Elastase mit dem SPMFKGV-CMK

5 µg Elastase wurden im Reaktionspuffer (100 mM Tris; pH 8) mit sinkenden Konzentrationen (0-500 µM) des SPMFKGV-CMKs vorinkubiert. 0,5 mM des KGKNSGSGATPV-pNA Substrates wurden zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert und gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen (Standardabweichung < 10%).

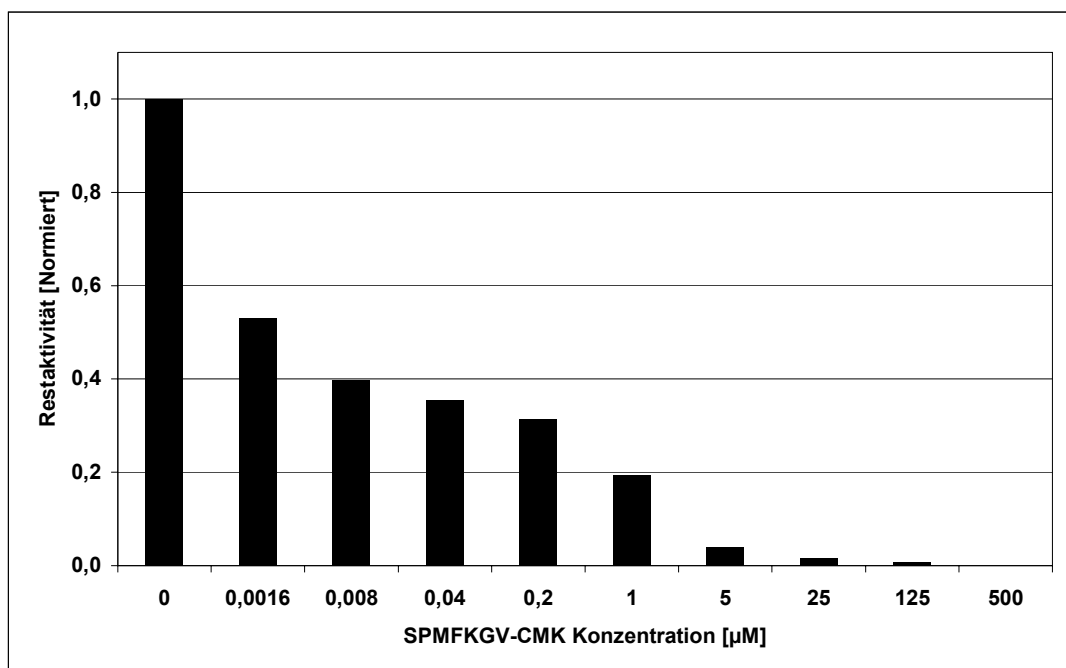


Abb. 5.32.b Bestimmung des IC_{50} von Subtilisin mit dem SPMFKGV-CMK

5 µg Subtilisin wurden im Reaktionspuffer (50 mM K_2HPO_4 ; pH 8) mit sinkenden Konzentrationen (0-500 µM) des SPMFKGV-CMKs vorinkubiert. 0,5 mM des SGRVVPGYGHA-pNA Substrates wurden zum Reaktionsstart hinzugegeben und ΔA_{405} für 1 h bei 37°C bestimmt. Die Aktivitäten wurden auf die Probe ohne Inhibitor normiert und gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration aufgetragen (Standardabweichung < 12%).

6. Diskussion

6.1. *DegP, eine Protease mit großer Toleranz gegenüber biochemischen Einflüssen*

Das Hitzeschockprotein DegP, dient der Zelle im Periplasma in seiner Doppelfunktion als Chaperon und Protease zur Aufrechterhaltung bestmöglicher Wachstumsbedingungen. Die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen tritt insbesondere im Periplasma, welches aufgrund der Zellarchitektur erhöhten Schwankungen der biochemischen Milieubedingungen unterliegt auf. Für DegP konnte gezeigt werden, dass es *in vivo* unter Stressbedingungen, ausgelöst durch erhöhte Temperatur, Veränderungen in der Osmolarität und pH-Werten, sowie durch oxidativen Stress und Pathogenität, essentiell ist (Pallen und Wren, 1997).

Durch die in dieser Arbeit entwickelten ersten pNA Substrate für DegP und die Etablierung eines quantifizierbaren Enzymaktivitätstests konnte erstmals die Toleranz von DegP gegenüber unterschiedlichen Stressbedingungen *in vitro* untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Serinprotease DegP in einem pH-Bereich von 4,5 bis 10,5 mit einem Optimum von 6,0 bis 9,0 eine sehr große pH-Toleranz zeigt. Eine ähnliche Unempfindlichkeit zeigt sich auch gegenüber von Salzen bzw. hoher Ionenstärke im Aktivitätstest. Bei einer Ionenstärke von 900 mM im Enzymtest, was in etwa dem 6fachen der Ionenstärke unter optimalen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen entspricht, liegt die spezifische Aktivität von DegP immer noch bei 50%.

Die Zugabe und der vollständige Entzug von bivalenten Kationen im Reaktionspuffer des Enzymtests führte zu keiner Veränderung der spezifischen Aktivität von DegP, was zeigt, dass die Proteasefunktion von DegP nicht von bivalenten Kationen abhängig ist, deren Vorkommen im Periplasma starken Schwankungen unterliegen kann.

Die von Skórko-Glonek *et al.* (Skórko-Glonek *et al.*, 2006) postulierte Sensibilität von DegP gegenüber Reduktionsmitteln konnte mit dem neuen quantifizierbaren Enzymtest nicht bestätigt werden. So zeigte DegP bis zu Konzentrationen von 1 mM DTT bzw. 100 mM β -Mercaptoethanol keine signifikante Abnahme der Aktivität. Auch dies ist ein Zeichen für die große Toleranz gegenüber unterschiedlichen biochemischen Einflüssen.

Zusammenfassend konnte somit *in vitro* für DegP eine robuste Proteasefunktion bestimmt werden, die für ein Hitzeschockprotein, insbesondere unter den verschiedenen Stressbedingungen, *in vivo* essentiell ist.

6.2. Allosterie, eine neue Regulation von DegP

6.2.1. DegP unterliegt einer allosterischen Aktivierung

Die Arbeiten von Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) haben unter anderem gezeigt, dass DegP eine Doppelfunktion als Chaperon und Protease aufweist. Der Wechsel zwischen diesen beiden Funktionen unterliegt dabei einem temperaturabhängigen Mechanismus. Bei Temperaturen unter 20°C dominiert die Chaperonfunktion, wohingegen bei Temperaturen über 30°C die Proteasefunktion in einem nichtlinearen Verhältnis zunimmt (Spiess *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde die spezifische Aktivität von DegP unter verschiedenen Bedingungen bestimmt, hierzu gehörte auch die Vorinkubation von DegP mit kleinen Peptiden, die Stresssignale simulieren sollten. Durch die Inkubation konnte die Proteaseaktivität um einen Faktor von bis zu acht erhöht werden. Eine derartige Erhöhung kann durch eine allosterische Aktivierung erklärt werden.

Allosterische Aktivierung ist bei Proteinen weit verbreitet. Bereits 1965 wurde von Monod, Wyman und Changeux die erste Theorie des allosterischen Mechanismus aufgestellt, die seitdem als MWC Theorie bekannt ist (Monod *et al.*, 1965). Grundlage dieses Mechanismus ist die Ligandenbindung an ein Protein, die zu mindestens zwei unterschiedlichen Strukturen dieses Proteins führt. Hierbei handelt es sich um die im Gleichgewicht befindliche starre, ungebundene Struktur (T(ense)-Struktur) und die flexible, substratgebundene Struktur (R(elaxed)-Struktur). Im Vergleich zur intrasterischen Regulation unterscheidet sich die allosterische Regulation dadurch, dass die Bindung der aktivierenden oder hemmenden Liganden an einer regulatorischen Untereinheit stattfinden, die räumlich vom aktiven Zentrum entfernt liegt (Kobe und Kemp, 1999).

Die MWC Theorie wurde durch Koshland (Koshland *et al.*, 1966) und Eigen (Eigen, 1967) um den Faktor der Kooperativität erweitert. Kooperativität beschreibt die positive oder

negative Rückkopplung vermittelt durch die Bindung eines Liganden an ein Protein mit multiplen Bindestellen. Die Auftragung z.B. der messbaren Aktivität eines Proteins gegen die Ligandenkonzentration einer positiven kooperativen Bindung führt generell zu einem sigmoidalen Verlauf des Graphens (Ricard und Cornish-Bowden, 1987).

Im weiteren kann bei der allosterischen Regulation zwischen zwei Effekten unterschieden werden. Bei dem sogenannten homotropen Effekt handelt es sich um identische Moleküle (z.B. Substrate), die durch die Bindung an das Protein die allosterische Regulation auslösen und beeinflusst werden. Wenn unterschiedliche Liganden an der Bindung und dem Umsatz beteiligt sind (z.B. Substrat und Effektormoleküle), wird diese Interaktion heterotroper Effekt genannt. In beiden Fällen kann sowohl Kooperativität und Allosterie, als auch positive und negative Regulation beobachtet werden, die zu einer Steigerung bzw. Abnahme der Bindungsaffinität oder Aktivität führen. Auch diese Erweiterung deckt sich mit den Prinzipien der MWC Theorie.

Durch die jahrzehntelangen Forschungsarbeiten von Perutz (Perutz, 1970, 1972; Perutz *et al.*, 1998) über die Struktur und Eigenschaften von Hämoglobin konnte dieses Protein als erstes Modellprotein für die allosterische Regulation charakterisiert werden. Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten, zwei α -Ketten und zwei β -Ketten, wobei jede Untereinheit eine Sauerstoffbindestelle und eine Hämgruppe aufweist. Diese Hämgruppe besteht aus einem organischen Teil (Protoporphyrin) und einem Eisenatom. Die Bindung von Sauerstoff führt zu einer strukturellen Änderung der Hämgruppe der bindenden Untereinheit (tertiäre Strukturänderung) und zusätzlich zu strukturellen Änderungen der anderen Untereinheiten (quartäre Strukturänderung). Die dabei entstehende neue oxydierte Ausrichtung von Hämoglobin ist flexibler und wird nach der MWC Theorie der allosterischen Regulation R-Struktur genannt, die desoxydierte starre Form ist die T-Struktur.

Entscheidend insbesondere für die *in vivo* Funktion von Hämoglobin ist, dass die Bindung eines Sauerstoffatoms die Bindungsaffinität des Hämoglobins für weitere Sauerstoffmoleküle erhöht und sie für CO_2 und H^+ reduziert. Umgekehrt senkt die Bindung von CO_2 und H^+ die O_2 -Bindungsaffinität des Proteins. Durch diese allosterische Regulation nach der MWC Theorie ist Hämoglobin das wichtigste Protein im Sauerstofftransportsystem von Vertebraten.

Die allosterische Regulation von allgemeinen Proteinen, wie bei Hämoglobin erörtert, unterscheidet sich von der von Proteasen. Wie beschrieben binden Substrate, wie z.B. Sauerstoff, an die Proteine und verursachen durch Bindungen strukturelle Veränderungen

des Zielproteins, die wiederum die Bindungseigenschaften dieser für weitere Substrate verändern. Bei Proteasen führt die Bindung von Substraten, aber vor allem von sogenannten Effektoren dazu, dass die eigene Proteasefunktion entweder positiv oder negativ beeinflusst wird. Dabei findet die Bindung der Liganden an den regulatorischen Untereinheiten des Proteins statt, die dann durch strukturelle Veränderungen die Proteasefunktion beeinflusst. Beispiele für allosterisch regulierte Proteasen gibt es aus den verschiedensten Proteasefamilien. Einige Mitglieder der Matrixmetalloproteasen (MMP) zeichnen sich hierdurch aus. Sie werden wie alle MMP zuerst in einen proteolytisch inaktiven Zustand (proMMP) translatiert. Dieser Zustand wird durch die Interaktion des konservierten Cysteins und dem Zinkion erreicht und muss zur Aktivierung der Proteasefunktion aufgelöst werden. Dies kann mittels Proteolyse durch eine andere MMP erfolgen oder aber durch eine allosterische Aktivierung mit anschließender Autoproteolyse (Fu *et al.*, 2008). Pilcher (Pilcher *et al.*, 1997) und Duman (Duman *et al.*, 2001) konnten über dies hinaus zeigen, dass die proMMP Collagenase-1 durch Substratbindung ohne Abspaltung der sogenannten pro-Domäne aktiviert werden kann. Eine vergleichbare allosterische Aktivierung durch Substratbindung konnte ebenso durch die Arbeiten von Bannikov (Bannikov *et al.*, 2002) an Gelatinase B gezeigt werden.

Auch *E. coli* Proteasen, wie z.B. der Proteasekomplex HsIVU, sind allosterisch reguliert. HsIVU ist eine Protease aus dem Clan PB, welche sich durch die Kombination von Serin-, Threonin- und Cysteinproteasen auszeichnet. HsIVU ist in Abwesenheit der Aktivatoren in Form von kleinen Nukleotiden nur basal aktiv und wird nicht wie die MMPs durch Substrate aktiviert, sondern vielmehr durch einen Effektor. Erst die Inkubation mit den aktivierenden Nukleotiden und unterschiedlichen nicht hydrolysierbaren ATP Analogen führt zu einer Stimulation der Proteasefunktion (Bogyo *et al.*, 1997; Sousa *et al.*, 2000; Groll *et al.*, 2005).

Eine ganz ähnliche allosterische Aktivierung konnte auch für Serinproteasen aus dem S1 Clan, zu dem auch DegP gehört, bestimmt werden. Die humanen Proteasen Thrombin und das im Gewebe vorkommende Kallikrein sind ohne die Bindung kleiner Effektoren nahezu inaktiv. Die Bindung Na^+ an Thrombin bzw. von Zn^{2+} an Kallikrein führen *in vivo* wie von der MWC Theorie gefordert zur strukturellen Veränderung innerhalb der beiden Serinproteasen und damit zu einer allosterischen Aktivierung der Proteasefunktion (Di Cera *et al.*, 2007; Pampalakis und Sotiropoulou, 2007).

Von besonderen Interesse für dieses Arbeit ist, dass eine vergleichbare allosterische Aktivierung für das DegP Homolog DegS, dessen Proteasedomäne ebenfalls im

Periplasma von *E. coli* lokalisiert ist, gezeigt werden konnte (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004). Dieses Protein wird erst nach der Bindung von Aktivatorpeptiden mit der C-terminalen Konsensussequenz der Außenmembranproteine (-YXF) an seine PDZ Domäne enzymatisch aktiv. Aufgrund der Kristallstruktur und enzymatischen Aktivitätsbestimmung konnte gezeigt werden, dass unter anderem die vorletzte Aminosäure dieser Aktivatorpeptide eine wichtige Rolle für die Qualität der Bindung und somit der Aktivierung von DegS einnimmt (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass das an die PDZ Domäne gebundene Aktivatorpeptid spezifisch mit der Protease Domäne interagiert. Der L3 Loop von DegS übermittelt durch direkten Kontakt zur PDZ Domäne und dem gebundenen Aktivator die Bindungsinformation an das aktive Zentrum. Dieses aktive Zentrum wiederum wird aus dem L1, L2 und dem LD Loop gebildet. Die Neuausrichtung dieser Loops führt zu einer Aktivierung der Proteasefunktion von DegS. Dies ist ein typisches Beispiel für eine allosterische Aktivierung.

Um eine ähnliche Regulation der DegP Aktivität nachzuweisen, wurden zu DegS vergleichbare Analysen mit DegP durchgeführt. Es wurden Peptide mit der Sequenz DNRLGLVYXF synthetisiert, wobei insgesamt zehn Varianten der vorletzten Aminosäure ausgewählt wurden. Die Analyse im etablierten pNA Enzymtest zeigte, dass wie für DegS die Aktivierung durch diese Peptide abhängig von der vorletzten Aminosäure ist. Je nach ausgewählter Aminosäure konnte eine 1,1fache (-YIF) bis 2,5fache (-YFF) Aktivierung bestimmt werden. Insgesamt konnte eine vergleichbare, wenn auch nicht identische, Aktivierung durch die Peptidvarianten von DegP und DegS ermittelt werden, was die für DegS postulierte allosterische Aktivierung (Walsh *et al.*, 2003) auch für DegP bestätigen konnte.

Durch die Enzymaktivitätstests mit weiteren Peptiden, welche den C-Termini des Außenmembranproteins OmpC, des periplasmatischen Proteins Alkalische Phosphatase (PhoA) und des Proteins α -Amylase (MalS) entsprachen, konnten zusätzliche Informationen über die allosterische Aktivierung gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass neben der vorletzten Aminosäure der Peptide ebenfalls Aminosäuren aus dem weiterentfernten N-terminalen Bereich an der Aktivierung beteiligt sein müssen. Mit dem Decapeptid DNRLGLVYQF konnte eine 1,5fache Aktivierung der DegP Enzymaktivität ermittelt werden, wohingegen für das OmpC Peptid mit der Sequenz IVALGLVYQF eine 3fache Aktivierung bestimmt wurde. Obwohl beide Peptide den gleichen C-Terminus -YGF aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrem Aktivierungs-

potential. Somit ist die für DegS bestimmte Abhängigkeit der Aktivierung von der vorletzten Aminosäure nicht der einzige Faktor, von dem die allosterische Aktivierung abhängt. Unter der Annahme, dass der potentielle Aktivator wie bei DegS an die PDZ Domäne von DegP bindet, müssen bei dieser Bindung weitere Aminosäuren von entscheidender Rolle sein. Zur Lösung dieser Fragestellung sind Mutantenanalysen innerhalb der PDZ Domänen und die in Kooperation mit dem IMP in Wien laufende Aufklärung der Kristallstruktur von DegP mit kleinen definierten gebundenen Aktivatorpeptiden von großer Bedeutung. Hierdurch sollten die beteiligten Aminosäuren des Aktivators und DegPs sowie die strukturellen Veränderungen innerhalb von DegP bei der allosterischen Aktivierung bestimmt werden. Erste Informationen über die Strukturänderungen konnte bereits durch die in dieser Arbeit durchgeführten Oligomerisierungsversuche gewonnen werden, die unter 6.3.2. *Die allosterische Aktivierung führt zu einem hocholigomeren, aktiveren Zustand der Protease* diskutiert werden.

Zusammenfassend kann bereits hier für DegP eine allosterische Regulation mit einem heterotropen Effekt, also einer Aktivierung durch Aktivatorpeptide und einer hierdurch gesteigerten Proteolyse eines Substrates, postuliert werden. Die Proteasefunktion ist dabei reversibel (de-)aktivierbar. Wie nach der MWC-Theorie beschrieben, stehen die sogenannte T- und die R-Struktur in einem Gleichgewicht. Dies hat zur Folge, dass nach dem vollständigen Verdau der Substrate keine weitere allosterische Aktivierung erfolgt und sich so das dynamische Gleichgewicht zur nicht aktivierten T-Struktur von DegP verschieben wird.

6.2.2. Die allosterische Aktivierung ermöglicht eine effektive zelluläre Stressantwort

Im Laufe dieser Arbeit konnte neben der bereits bekannten temperaturabhängigen Aktivierung (Spiess *et al.*, 1999) eine weitere Aktivierung, die allosterische Aktivierung, bestimmt werden. Unter Berücksichtigung des Aufgabenfeldes von DegP ist diese Art der Aktivierung *in vivo* sicherlich von großer Bedeutung. Wie bereits erörtert, ist DegP ein wichtiger Faktor bei der Stressantwort auf erhöhte Temperaturen, aber auch bei Veränderungen in der Osmolarität, den pH-Werten und bei oxidativem Stress und Pathogenität (Pallen und Wren, 1997). Nicht alle Stressbedingungen treten in Kombination

mit Temperaturen über 30°C auf, was bedeutet, dass DegP ohne ein weiteres Aktivierungssystem in seiner Funktion als Chaperon vorliegen würde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass durch die Inkubation mit aktivierenden Peptiden, aber auch durch die Inkubation mit un- bzw. fehlgefalteten Proteinen wie β -Casein, MalS und OmpC, schon bei Temperaturen um 20°C die DegP Proteasefunktion aktiviert und somit die Chaperonfunktion deaktiviert werden kann. Die oben genannten Stressbedingungen führen alle unter anderem zur Fehlfaltung von Proteinen im Periplasma, die dann als aktivierendes Signal dienen können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die primäre Proteolyse von diesen Proteinen, die zu kleinen aktivierenden Peptiden führt, durch eine Art positive Feedbackschleife die Aktivität von DegP erhöhen. Diese Eigenschaften ermöglichen es DegP *in vivo* als universelle Stressantwort zu agieren.

6.3. Strukturelle Veränderung durch die Allosterie und die dabei beteiligten Bereiche von DegP

6.3.1. Aufgabe der PDZ1 Domäne bei Proteolyse und allosterischer Aktivierung

PDZ Domänen wurden erstmals in den Proteinen PSD-95 (post-synaptic density Protein), DLG (Discs Large Protein) und ZO-1 (zonula occludens-1 Protein) gefunden und hiernach benannt. Primär wurde ihnen die klassische Funktion der Bindungsstelle für Protein-Protein Wechselwirkungen zugeschrieben. Hierbei erkennen sie speziell die drei bis vier letzten Aminosäuren des C-Terminus der Zielproteine und binden an diese (Harrison, 1996; Harris und Lim, 2001). Weiterführende Arbeiten konnten zusätzliche Funktionen der PDZ Domänen deutlich machen. Insbesondere durch die Kombination von PDZ und Protease Domänen innerhalb eines Proteins erweitern sich die Funktionsmöglichkeiten der PDZ Domänen. So bieten die definierten Bindungseigenschaften der unterschiedlichen PDZ Domänen für die C-Termini von Substraten eine Möglichkeit, die Substratspezifität der Proteasen zu erhöhen. In diesem Zusammenhang konnte durch die Arbeiten von

Beebe *et al.* (Beebe *et al.*, 2000) gezeigt werden, dass die PDZ Domäne von Tsp (Tail-specific Protease) spezifisch Substrate bindet und sie für die Proteolyse fixiert. Tsp erkennt und bindet mittels dieser Domäne ein 11 Aminosäuren langes SsrA Signal, welches ein Kennzeichen von fehlgefaltetem Protein durch eine abgebrochene Translation darstellt und verdaut das hierdurch präsentierte Substrat in einem definierten Bereich (Keiler *et al.*, 1996; Beebe *et al.*, 2000). Auch für DegP konnte gezeigt werden, dass es einige der C-terminalen Sequenzen der SsrA Signale und des Substrates PapE pilin erkennt und die Proteine verdaut (Jones *et al.*, 2002; Spiers *et al.*, 2002; Iwanczyk *et al.*, 2007).

Für die Entwicklung der pNA Substrate wurden Komplettverdauanalysen der Citratsynthase und Malatdehydrogenase durch DegP durchgeführt. Hierbei ergaben sich Proteolyseprodukte zwischen 6 und 20 Aminosäuren. Diese definierten Fragmentgrößen lassen darauf schließen, dass wie bei Tsp (Beebe *et al.*, 2000; Spiers *et al.*, 2002) auch bei DegP eine Fixierung durch die PDZ1 Domäne dazu führt, dass die Proteolyse in jeweils klar definierten Abständen stattfindet. Diese Annahme wird durch die Arbeiten von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2008-2) unterstützt, die ähnliche Fragmentgrößen bei Analysen des Komplettverdaus mit DegP bestimmten und überdies hinaus zeigen konnten, dass DegP diese Substrate prozessiv verdaut. Insbesondere die prozessive Proteolyse macht deutlich, dass die Hypothese der Bindung durch die PDZ Domäne und anschließende Proteolyse im aktiven Zentrum korrekt ist. Durch die definierte Distanz von PDZ Domäne und aktivem Zentrum können die in den Komplettverdauanalysen bestimmten Fragmentgrößen erklärt werden. Die Schwankung der Produktlänge zwischen 6 und 20 Aminosäuren verdeutlicht die von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2002) postulierte, relativ große Flexibilität der PDZ Domänen.

Die in dieser Arbeit bestimmte Aktivierung der DegP Proteasefunktion durch Stresssignale in Form von kleinen Peptiden und fehlgefalteten Proteinen wirft die Frage auf, welche Domäne innerhalb von DegP für diese allosterische Aktivierung zuständig ist. Wie bereits unter 6.2.1. *DegP unterliegt einer allosterischen Aktivierung* diskutiert, ist unter anderem aufgrund der Röntgenkristallstrukturanalyse und Aktivitätstests von DegS bekannt, dass dieses HtrA Familienmitglied in *E. coli* durch die Bindung der C-Termini von Außenmembranproteinen allosterisch aktiviert wird (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004). Hierbei konnte eine weitere Funktion der PDZ Domäne verdeutlicht werden. Sie bindet und fixiert nicht nur die Substrate, sondern sie zeichnet sich auch zusätzlich durch eine regulatorische Funktion der Proteasefunktion des Proteins aus. Die Substratbindung

führt zu strukturellen Veränderungen innerhalb des Proteins, so dass der aktive Zustand des katalytischen Zentrums erreicht werden kann, was der allosterischen Aktivierung von DegS entspricht. Es ist zu vermuten, dass die Funktion der allosterischen Regulation in DegP ebenfalls durch die PDZ1 Domäne ausgeführt wird. D.h., dass diese PDZ Domäne die Aktivatorpeptide bindet und durch strukturelle Veränderungen in der Protease die Zugänglichkeit und die korrekte Ausrichtung der katalytischen Triade, der Oxyanion Höhle, sowie der Substratspezifitätstasche einleitet (siehe hierzu auch 6.3.3. *Der LA Loop ist ein wichtiger Faktor für die Oligomerisierung von DegP*). Zur Klärung der genauen Funktion und der beteiligten Bereiche der PDZ Domänen und Protease Domäne von DegP, werden bereits Mutantenanalysen durchgeführt (Kucz, unveröffentlicht).

6.3.2. Die allosterische Aktivierung führt zu einem hocholigomeren, aktiveren Zustand der Protease

Durch die Arbeiten von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2002) konnte die Kristallstruktur des DegP Hexamers gelöst werden. Durch DegP Oligomerisierungsanalysen mittels Gelfiltration, Cross Link Methode und analytischer Ultrazentrifugation mit und ohne Aktivatorpeptide und Volllängenprotein β -Casein konnte eine Veränderung der Oligomerisierung gezeigt werden. Diese zeigte, dass DegP ohne die Bindung des Aktivators in einem hexameren Zustand vorliegt. Die Bindung des Aktivators an DegP führt zu einer deutlichen Verschiebung der Oligomerisierung zum Dodecamer und 24mer. Die Hypothese, dass DegP neben dem Hexamer weitere hocholigomere Zustände aufweisen könnte, wurde bereits in anderen Arbeiten aufgestellt. Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999) postulierten, dass das DegP Dodecamer aus zwei gestapelten Hexameren gebildet wird. Die neuesten Arbeiten von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2008) bestätigen sowohl die Hypothese von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1999) als auch die hier präsentierten Ergebnisse. Zeitgleich zu dieser Arbeit wurde in der Kooperationsgruppe am IMP in Wien die Kristallstruktur des DegP 24mers gelöst. Die Bestimmung der Struktur des 24mers konnte nur bei gleichzeitiger Bindung von fehlgefalteten Proteinen, in diesem Fall von Außenmembranproteinen (Omps), erfolgen. Aufgrund der konformationellen und chemischen Heterogenität konnte die Struktur und Position der Omps innerhalb des DegP 24mers nicht bestimmt werden. Wie bei der hexameren Struktur ist das Trimer der

prinzipielle Grundbaustein des 24mers. Acht dieser Trimere bilden einen Käfig mit einer Wandstärke von 31 Å und einer Gesamthöhe von 195 Å. Der resultierende Innenraum hat einen Durchmesser von 110 Å, wodurch theoretisch ein Protein mit einem Molekulargewicht von bis zu 300 kDa in diesen Raum eingelagert werden könnte (Abb. 6.1.) (Krojer *et al.*, 2008).

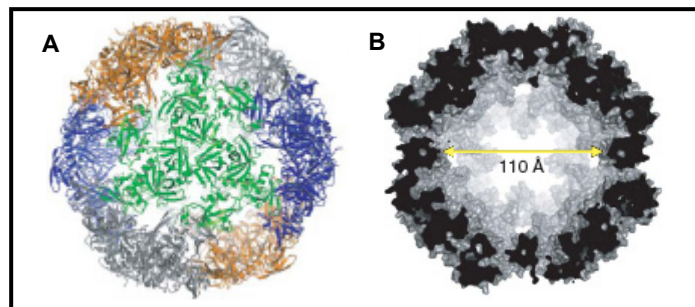


Abb. 6.1. Struktur des DegP 24mers (Krojer *et al.*, 2008)

A) Kristallstruktur des DegP 24mers; die 8 Trimeren Untereinheiten sind in unterschiedlichen Farben markiert. B) Querschnitt des DegP 24mer mit in dunkel grau eingefärbter Schnittstelle. Der Innendurchmesser des Innenraums beträgt 110 Å.

Der Zugang zu diesem Innenraum wird durch unterschiedlich große Poren ermöglicht. Die größten Poren haben einen Durchmesser von 35 Å, die kleineren Poren von 14 Å. Das aktive Zentrum der Protease ist im Innenraum lokalisiert, so dass die potentiellen Substrate in diesen transportiert werden müssen. Aufgrund der Porengrößen könnten somit nur zumindest partiell ungefaltete Proteine in das Innere gelangen.

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass DegP sich um das Substrat herum zum 24mer ausbildet, das Substrat umschließt und dann erst proteolysiert (Krojer *et al.*, 2008). Insbesondere diese Möglichkeit lässt die Hypothese zu, dass das DegP Hexamer nur eine Art Ruhezustand der Protease darstellt. Wie bereits unter 6.2.1. *DegP unterliegt einer allosterischen Aktivierung* andiskutiert, besagt die Theorie zur allosterischen Regulation von Monod, Wyman und Changeux, kurz MWC Theorie, dass es stets mindestens zwei unterschiedliche Strukturen des allosterisch regulierten Proteins geben muss (Monod *et al.*, 1965). Hierbei wird der Zustand ohne Ligand als T-Struktur und der meist aktivere mit Ligand gebundene Zustand als R-Struktur betitelt. Nach der MWC Theorie wäre das DegP Hexamer die T- und die hocholigomeren Zustände des Dodecamers und 24mers die R-Strukturen.

Diese Hypothese kann durch weitere Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt werden. Durch die Trennung der Hexamere, Dodecamere und 24mere mittels präparativer Gelfiltration

und anschließender Bestimmung der spezifischen Aktivität von den jeweiligen oligomeren Zuständen konnte gezeigt werden, dass die beiden hocholigomeren Zustände eine etwa 30fach höhere spezifische Aktivität als das Hexamer aufweisen.

6.3.3. Der LA Loop ist ein wichtiger Faktor für die Oligomerisierung

Die Struktur von DegP als Hexamer zeigt, dass die Protease Funktion durch eine Loop Triade, gebildet aus dem LA-Loop (Aminosäure 36-81) eines Monomers des einen Trimers und den Loops L1 (Aminosäure 205-209) und L2 (Aminosäure 227-238) eines Monomers des gegenüberliegenden Trimers, inhibiert wird. Die Inhibierung erfolgt hierbei zum einen durch die Blockierung des Zugangs zum aktiven Zentrum und zum anderen durch eine Fehlorientierung der katalytischen Triade, der Oxyanion Höhle und der Substratspezifitätstasche. Zur genaueren Untersuchung der Funktion der Loop Triade wurden Punktmutationen der für die Stabilität der Loop Triade essentiellen Aminosäuren im LA Loop eingeführt und diese funktionell und strukturell untersucht. Die Analysen der LA Loop Einzel- (DegP_{N45F}), Doppel- (DegP_{N45F,Q47F}) und Dreifachmutanten (DegP_{N45F,Q47F,Q48F}) zeigte eine prinzipiell erhaltene Proteasefunktion, sowohl im pNA Enzymtest als auch im Caseinverdau. Ebenso konnte eine Komplementation des degP⁻ Phänotyps bei 43°C durch die Überexpression der Mutanten erreicht werden. Eine Aktivierung der Proteasefunktion war jedoch durch keinen der neu bestimmten Aktivatoren möglich. Diese Auffälligkeit ging mit einer weiteren einher. Die Oligomerisierungsanalysen zeigten, dass die Punktmutanten bereits zu einem sehr hohen Prozentsatz in einem hocholigomeren Zustand als Dodecamer bzw. 24mer vorlagen, ohne dass eine Zugabe von Aktivatoren benötigt wurde. Durch die hier postulierte Abhängigkeit der DegP Oligomerisierung zu Dodecamer und 24mer durch die Bindung der Aktivatoren an DegP kann vermutet werden, dass die hergestellten Mutanten keine Aktivatorbindung benötigen, um einen hocholigomeren Zustand zu erreichen. Dies kann damit begründet werden, dass die konformationelle Veränderung der Loop Triade aufgrund der Destabilisierung dieser durch die Punktmutanten im LA Loop bereits stattgefunden hat und somit die höher oligomeren Zustände bereits vorliegen.

Unterstützt wird diese Hypothese durch die neueste von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2008) gelöste Kristallstruktur des DegP 24mers. Detailaufnahmen der Loop Triade zeigen im

Vergleich zum Hexamer, dass beim 24mer die Loop Triade aufgelöst ist und katalytische Triade, Oxyanion Höhle sowie Substratspezifitätstasche korrekt ausgerichtet sind (Abb. 6.2.). Die Position des LA Loops konnte aufgrund sehr hoher Flexibilität dieses Loops in der Kristallstruktur nicht bestimmt werden, wodurch auch ebenfalls keine neuen Funktionen dieser Loops ermittelt werden konnten.

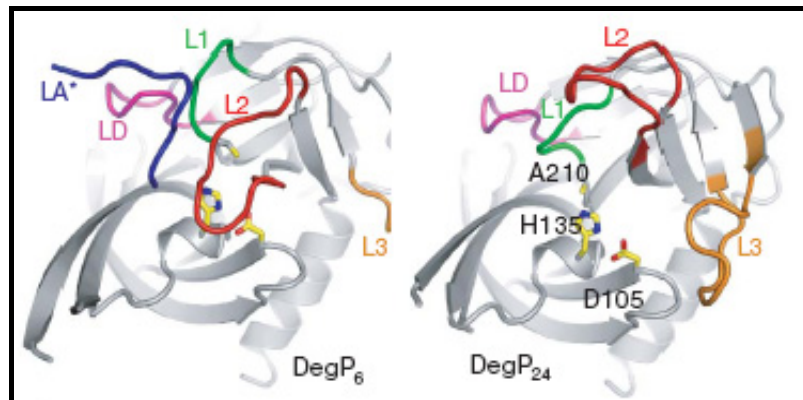


Abb. 6.2. Detailausschnitt der Loop Triade im Hexamer und 24mer von DegP (Krojer *et al.*, 2008)

Struktur der Protease Domäne des DegP Hexamers (DegP₆) und 24mers (DegP₂₄) mit farblich markierten Loops. Die mechanistisch wichtigen Loops LD (Aminosäure 168-175), L3 (Aminosäure 185-198), sowie der LA* Loop (Aminosäure 36-81) eines Monomers des einen Trimers, der L1 Loop (Aminosäure 205-209) und der L2 Loop (Aminosäure 227-238) eines Monomers des gegenüberliegenden Trimers, die die Loop Triade bilden, sind farblich markiert. Die Position der katalytischen Triade mit Histidin (H₁₀₅), Asparaginsäure (D₁₃₅) und Serin (S₂₁₀) ist ebenfalls angegeben. Die Loop Triade wird bei der Bildung des 24mers aufgelöst, sodass sich die katalytische Triade, die Oxyanion Höhle sowie die Substratspezifitätstasche ausbilden können. Die Positionierung des Loops LA* konnte aufgrund hoher struktureller Flexibilität im DegP 24mer nicht gelöst werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage: Ist der LA Loop an der Substratbindung beteiligt? Aufgrund der pNA Enzymtests lässt sich die Hypothese für eine zweite Funktion des LA Loop innerhalb der Protease DegP aufstellen. Für die Einzel- (DegP_{N45F}), Doppel- (DegP_{N45F,Q47F}) und Dreifachmutanten (DegP_{N45F,Q47F,Q48F}) konnte im Aktivitätstest mit dem SPMFKGV-pNA eine 2 bis 4fach höhere spezifische Aktivität als beim wt bestimmt werden, wohingegen die Mutanten mit dem DPMFKLV-pNA eine mit 10 bis 20% geringfügig reduzierte spezifische Aktivität im Vergleich zum wt aufzeigten. Unter der Berücksichtigung, dass die Punktmutanten bereits in einem hocholigomeren Zustand vorlagen und sich nicht weiter aktivieren ließen, sind die bestimmten spezifischen Aktivitäten für beide pNA Substrate zu niedrig. Die Untersuchungen des wildtypischen DegP zeigten im Enzymtest unter aktivierenden Bedingungen mit dem DPMFKLV-pNA eine weitere Erhöhung der spezifischen Aktivität bis zu einem Faktor von 2,4, wohingegen

die Mutanten keine Veränderung zeigten. Für das SPMFKGV-pNA wurden Erhöhungen bis zu einem Faktor von 8 bestimmt, wodurch diese doppelt so hohe spezifische Aktivitäten wie die Mutanten erreichten. Zusätzlich wurden Dodecamer und 24mer von wt DegP mittels Gelfiltration getrennt und im pNA Enzymtest eingesetzt. Hierbei wurden spezifische Aktivitäten ermittelt, die etwa um das 30fache höher lagen als die des Hexamers. Dies ist eine um das 5 bis 10fach höhere Aktivität bei gleicher Oligomerisierung als die für die Punktmutanten bestimmte.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der LA Loop im hocholigomeren DegP an der Substratbindung beteiligt sein könnte. Die Aufgabe des LA Loops könnte in der Fixierung des Substrates im Innenraum des 24mers liegen. Diese Aufgabe würde auch die hohe Flexibilität des LA Loops erklären, die die Auflösung dieses Loops in der Kristallstruktur des 24mers verhindert. Eine ähnliche Funktion wurde für die hochflexible PDZ Domäne im Hexamer postuliert (Krojer *et al.*, 2002).

Zur Aufklärung dieser Fragestellung sollte die Kristallstrukturanalyse von DegP mit gebundenem Inhibitor, wie das in dieser Arbeit entwickelte DPMFKGV-Boronsäurederivat, von großer Bedeutung sein. Durch diese Struktur könnte DegP im 24meren Oligomerisierungszustand fixiert und die an der Proteolyse beteiligten Aminosäuren bestimmt werden.

6.4. Eine mögliche Erweiterung der *in vivo* Funktionen von DegP

6.4.1. OmpC ein Substrat für Protease und Chaperon

Bei der DegP Reinigung nach Spiess *et al.* (Spiess *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, dass das Außenmembranprotein OmpC mit gereinigt wurde. Auch der zusätzliche Waschschriff mit 1 M NaCl führte dabei nicht zu der Ablösung des OmpC von DegP, wodurch eine unspezifische Bindung ausgeschlossen wurde. Überdies hinaus konnte gezeigt werden, dass das an DegP gebundene OmpC von DegP nicht proteolysiert wurde. Vergleichbare Ergebnisse ergaben die Arbeiten von Krojer *et al.* (Krojer *et al.*, 2008), die zusätzlich zeigten, dass es sich bei den gebundenen Außenmembranproteinen um gefaltete Monomere handelte. Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse die

von Rizzitello *et al.* (Rizzitello *et al.*, 2001) und Sklar *et al.* (Sklar *et al.*, 2007) postulierte DegP Funktion als Chaperon und in Kombination mit Skp und SurA die Beteiligung von DegP an der Assemblierung des Außenmembranproteins OmpC (2.4.2. *Die Chaperonfunktion von DegP*).

Eine zweite Eigenschaft von OmpC machen die Ergebnisse der pNA Enzymtests deutlich. Gereinigtes und denaturiertes OmpC wurde mit DegP vorinkubiert und anschließend in einen pNA Enzymtest eingesetzt. Hierdurch konnte eine Aktivierung der DegP Proteaseaktivität um das 2,6fache erreicht werden. Bei diesen eingesetzten Konzentrationen konnte kein anderer Aktivator eine Verbesserung der spezifischen Aktivität erreichen.

Mit OmpC wäre ein Substrat bestimmt worden, dass *in vivo* bei optimalen Wachstumsbedingungen als Chaperonsubstrat für DegP, unter Stressbedingungen jedoch als Aktivator und Substrat (Krojer *et al.*, 2008) für die Proteasefunktion von DegP dient. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, ob möglicherweise Abbauprodukte der Proteolyse von OmpC durch DegP als gute Aktivatoren für DegS dienen könnten. Diese Vermutung unterstützen die Arbeiten von Walsh *et al.* (Walsh *et al.*, 2003) und Wilken *et al.* (Wilken *et al.*, 2004), die zeigen, dass DegS durch die synthetisch hergestellte C-terminale Sequenz der Außenmembranproteine aktiviert wird. Hierdurch würde das von Alba *et al.* (Alba *et al.*, 2002) aufgestellte RpoE Transkriptionsregulationssystem noch intensiver mit DegP als Regulationsfaktor verbunden werden. Bisher wurde DegP, insbesondere nach der erhöhten Expression durch den alternativen Sigmafaktor RpoE, die Funktion als Protease zum Abbau der Stresssignale, in Form von fehlgefalteten Proteinen im Periplasma zugeschrieben (2.4.4.2. *Die RpoE Transkriptionsregulation*). Es ist jedoch ebenso möglich, dass DegP bereits einen Regulationsfaktor beim Auftreten der Stresssignale und der damit resultierenden Aktivierung der RpoE Transkriptionsregulation darstellt, da es OmpC abbaut und dadurch effektive Aktivatoren für DegS produziert (Abb. 6.3.a und Abb. 6.3.b).

6.4.2. Unterstützt DegP DegS als Protease des Antisigmafaktors RseA?

Die Analysen der Proteolyse von RseA durch DegP zeigten, dass RseA ein Substrat von DegP ist. Hierbei konnte zum einen deutlich gemacht werden, dass DegP den

periplasmatischen Bereich von RseA vollständig abbaut. Dies verdeutlicht eine mögliche weitere Funktion von DegP *in vivo*, da bisher noch nicht gezeigt werden konnte, welche Protease den unter Stressbedingungen in großen Mengen im Periplasma frei auftretenden C-Terminus von RseA abbaut. Im weiteren konnten durch zeitlich limitierten Verdau zwei distinkte Zwischenprodukte des Volllängenproteins RseA bestimmt werden, die erst bei längerer Inkubation vollständig in Produkte < 1 kDa abgebaut wurden. Durch die Elektrospray-Ionisationsmethode (ESI) konnten die Massen der beiden primären Produkte mit etwa 5.204 Da und etwa 7.985 Da ermittelt und somit die Schnittposition von DegP innerhalb von RseA bestimmt werden. Diese liegt zwischen der Aminosäure Valin an der Position 148 (V_{148}) und dem Serin an der Position 149 (S_{149}) was der Schnittstelle für DegS entspricht. Wie unter 2.4.4.2. *Die RpoE Transkriptionsregulation* erörtert, ist der alternative Sigmafaktor RpoE (σ^E) für die Transkription von Hitzeschockproteinen verantwortlich. Bei im Periplasma auftretenden Stresssignalen in Form von fehlgefalteten Außenmembranproteinen (Omps) wird durch diese eine proteolytische Kaskade des membrangebundenen Antisigmafaktors für σ^E , RseA, eingeleitet, an dessen Ende die Aktivierung des Sigmafaktors steht. Der limitierende Schritt in dieser proteolytischen Kaskade ist der erste Schnitt durch DegS innerhalb des periplasmatischen Bereiches von RseA. Durch diesen Schnitt zwischen V_{148} und S_{149} (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001; Alba *et al.*, 2002; Chaba *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003) und der von Collinet *et al.* (Collinet *et al.*, 2000) postulierten Abtrennung des RseB von RseA, folgen weitere Proteolyseschritte des Antisigmafaktors. Am Ende der Kaskade findet die Freisetzung von σ^E und die damit verbundene Regulation der Stressantwort statt.

Durch die Ergebnisse der ESI Untersuchungen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass DegP möglicherweise teilweise die Proteasefunktion von DegS übernehmen kann. Hierbei müsste es sich vermutlich um eine unterstützende Funktion handeln, da die Deletion von *degS in vivo* lethal ist (Alba *et al.*, 2001). Diese unterstützende Funktion würde jedoch der Zelle eine noch schnellere und effizientere Stressantwort ermöglichen, da der limitierende Faktor in der proteolytischen Kaskade zur Freisetzung von σ^E aufgehoben würde.

Kombiniert mit der unter 6.4.1. *OmpC ein Substrat für Protease und Chaperon* postulierten Doppelfunktion von DegP, kann das σ^E Transkriptionsregulationssystem nach Alba *et al.* (Alba *et al.*, 2007) (2.4.4.2. *Die RpoE Transkriptionsregulation*) erweitert werden (Abb. 6.3.a und Abb. 6.3.b). In dieser Erweiterung übernimmt DegP mit Skp und SurA zum einen unter stressfreien Bedingungen als Chaperon für die Maturation der Omps eine

wichtige Aufgabe. Zum anderen führt DegP unter Stressbedingungen die Proteolyse der fehlgefalteten Omps durch, wobei die Proteolyseprodukte wiederum DegS aktivieren. Ergänzend hierzu kann DegP, aktiviert durch allosterische Aktivierung, den Antisigmafaktor RseA primär an der Position V₁₄₈ proteolysieren und im Anschluss den freiwerdenden periplasmatischen Bereich vollständig abbauen. Hierdurch wäre die Stressantwort noch schneller und effektiver mit den Stresssignalen verknüpft.

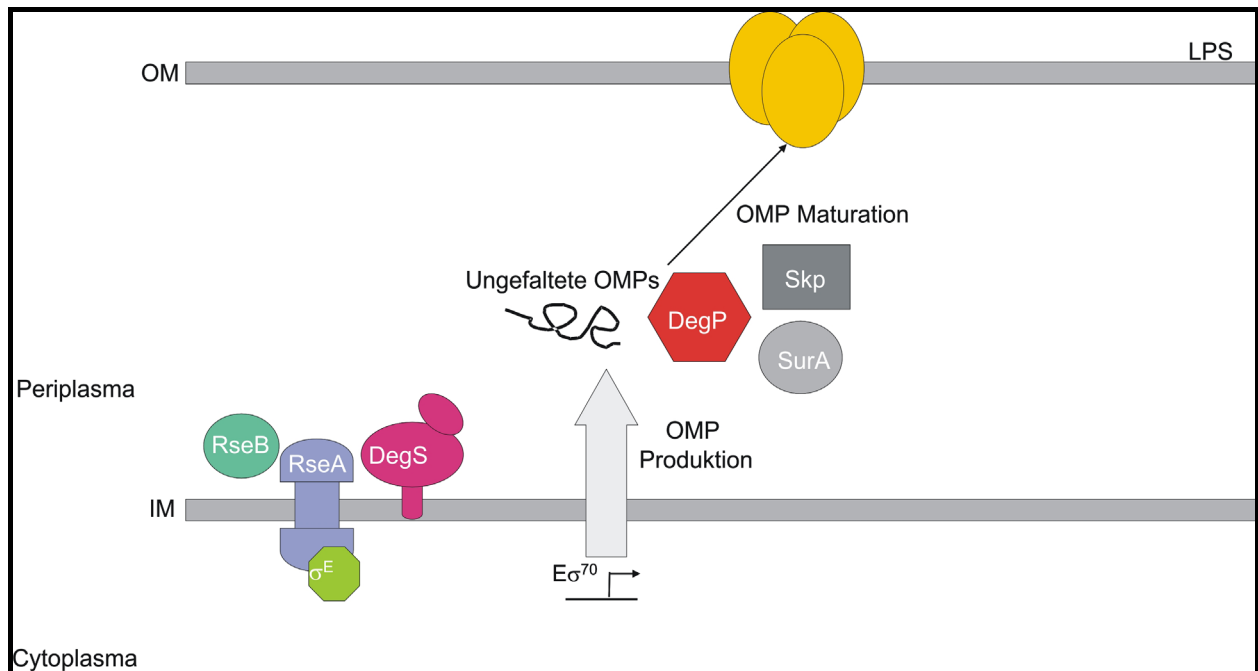


Abb. 6.3.a Erweiterte Darstellung der σ^E Transkriptionsregulation unter stressfreien Bedingungen

Unter stressfreien Bedingungen erfolgt die Genexpression unter dem „housekeeping“ Sigmafaktor σ^{70} . Unter anderem werden die Außenmembranproteine von diesem Sigmafaktor exprimiert und im weiteren ins Periplasma transportiert. Dort erfolgt die Maturation durch die periplasmatischen Chaperone DegP, SurA und Skp. Der alternative Sigmafaktor RpoE (σ^E) wird durch Bindung an den RseA/RseB Komplex inhibiert und DegS liegt im inaktiven Zustand vor. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid; Omp, Außenmembranprotein

6.5. Die Substratspezifität von DegP im Vergleich zu humanen Serinproteasen

Bei der Entwicklung eines quantifizierbaren pNA Enzymtests für DegP zeigten die Analysen der Komplettverdau, dass DegP die Vollängenproteine Citratsynthase und Malatdehydrogenase in Peptidprodukte mit einer Länge von 6 bis 20 Aminosäuren verdaut. Die Auswertung der Produktsequenzen ergab eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für

Valin, Alanin und Isoleucin an der Position P₁. Diese Ergebnisse bestätigten die postulierte Spezifität von DegP für Valin an dieser Position (Kolmar *et al.*, 1996).

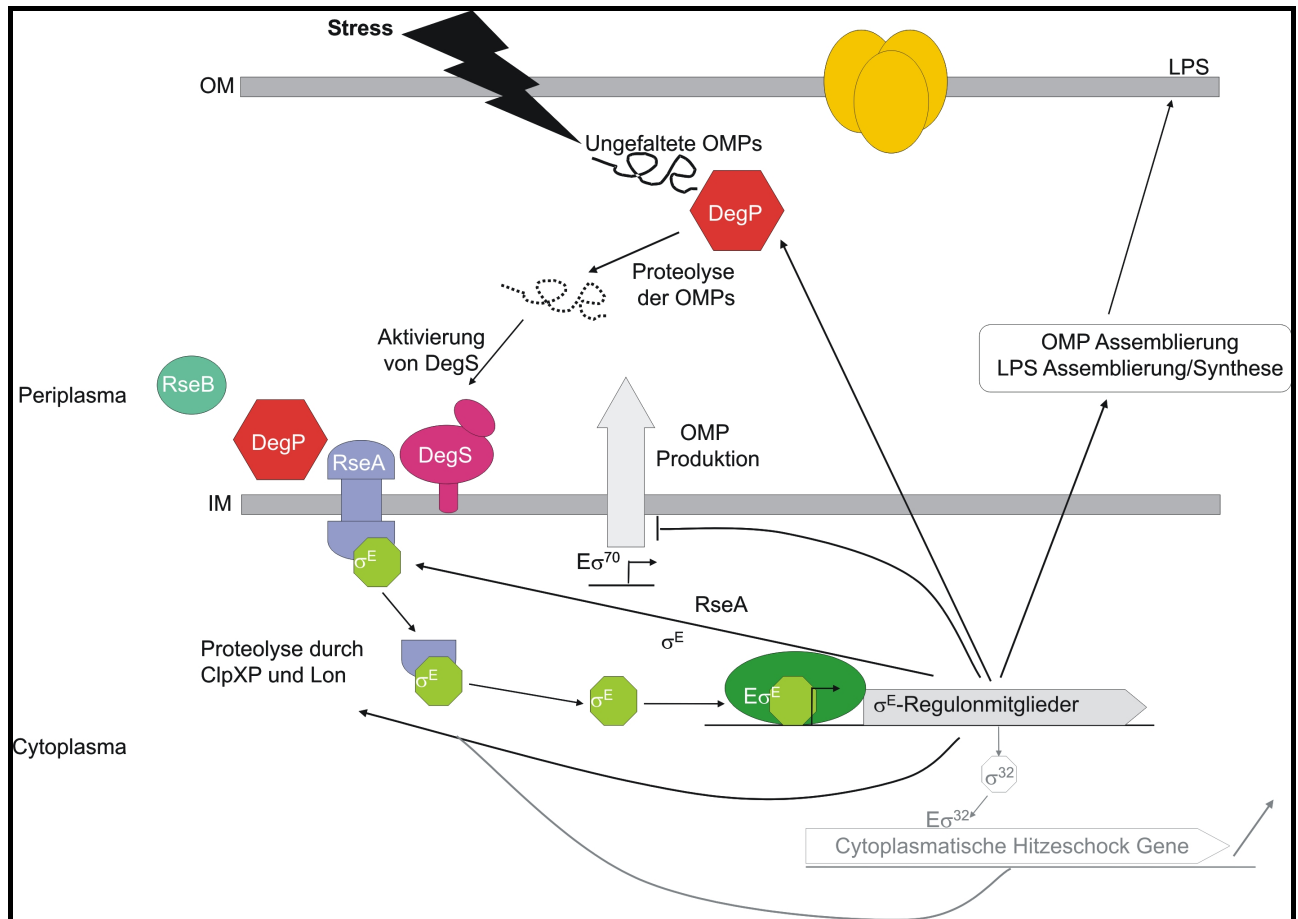


Abb. 6.3.b Erweiterung der Darstellung des σ^E Transkriptionsregulationsmechanismus unter stressfreien Bedingungen nach Gross *et al.* (Gross *et al.*, 2007)

Die Stresssignale in Form von ungefalteten Außenmembranproteinen führen zur Proteolyse dieser durch die Protease DegP. Die Produkte dieser Proteolyse führen durch Bindung an DegS zur Aktivierung der Proteasefunktion. Hierdurch kann DegS den primären Schnitt des Antisigmafaktors RseA durchführen. Die gleiche Funktion kann DegP unterstützend ausführen. Durch Abtrennung von RseB und weiterer Proteolyse Schritte durch RseP, ClpXP und Lon erfolgt die Freisetzung des Hitzeschock Sigmafaktors RpoE (σ^E), der die Gene des σ^E Regulons kontrolliert. Unter anderem wird DegP in seiner Expression hochreguliert, was die Stressantwort verstärkt. OM, Außenmembran; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid; Omp, Außenmembranprotein.

Obwohl die acht aus den Kompletterverdaus gewählten synthetisch hergestellten pNA Substrate entweder ein Valin oder Alanin an der Position P₁ aufwiesen, zeigte nur ein Substrat eine quantifizierbare spezifische Aktivität. Der Austausch einzelner Aminosäuren des SPMFKGV-pNA erbrachte ein zweites Substrat (DPMFKLV-pNA) mit einer hohen spezifischen Aktivität.

Eine ebenfalls hohe Spezifität konnte für die synthetischen Inhibitoren in Form von Chloromethylketon- (CMK) und Boronsäurederivaten bestimmt werden. Auch hier konnten nur die CMK und Boronsäurederivate mit den Aminosäuresequenzen SPMFKGV und DPMFKLV als Inhibitoren mit einer 100%igen Inhibierung bestimmt werden.

Zur Bestätigung der Substratspezifität von DegP und im Hinblick auf mögliche medizinische Applikationen in Form von Nachweisverfahren von bakteriellem Befall, wurden neun pNA Substrate und sechs CMK Inhibitoren, unter anderem eines der Substrate und der Inhibitoren von DegP, mit sechs humanen und einer Serinprotease aus *B. subtilis* getestet. Wie zu erwarten war, zeigte die Serinprotease Subtilisin aus *B. subtilis* eine sehr geringe Spezifität. Durch die Arbeiten von Markland und Smith (Markland und Smith, 1971) ist bereits bekannt, dass sich Subtilisin durch eine erhöhte Präferenz für Alanin (A), aber auch eine geringe für Valin (V) und Glycin (G) an P₁ auszeichnet, so dass bei den neun hier getesteten pNA Substraten sechs eine quantifizierbare spezifische Aktivität und bei vier von sechs CMK Inhibitoren eine Inhibierung zwischen 85 und 100% bestimmt werden konnte. Zu diesen Substraten und Inhibitoren gehörten jeweils auch die für DegP bekannten. Insgesamt fünf der sechs humanen Serinproteasen zeigten keine quantifizierbare Enzymaktivität und Inhibierung durch das DegP Substrat und den DegP Inhibitor. Einzig Elastase zeigte mit $7 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ eine weniger als 50%ige spezifische Aktivität im Vergleich zu DegP. Der für Elastase bestimmte Wert der Halbinhibierung (IC₅₀) für das getestete SPMFKGV-CMK lag mit 220 μM etwa 3 mal so hoch wie der für DegP bestimmte.

Die Ergebnisse zeigen, dass die für DegP bestimmten Substrate und Inhibitoren eine relative hohe Spezifität aufweisen und somit für einen spezifischen Nachweis von DegP und möglicherweise für ein Nachweisverfahren von bakteriellem Befall geeignet sind.

6.6. Ausblick: Die Charakterisierung von DegP und deren Bedeutung für andere Proteasen und mögliche medizinische Anwendungen

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen die erste quantitative, biochemische Charakterisierung von DegP. Die Substratspezifität und eine neue Regulation, die

allosterische Aktivierung, konnten ermittelt werden. Darüber hinaus konnte eine mit der Aktivierung einhergehende Veränderung des oligomeren Zustandes von DegP bestimmt werden, wodurch gezeigt wurde, dass die bisher postulierte hexamere Struktur scheinbar eine Art des proteolytischen Ruhezustandes ist und das Dodecamer und 24mer die aktiven DegP Formen darstellen. Durch Mutantenanalysen im LA Loop konnte eine wichtige Rolle dieser Struktur für die Oligomerisierung und somit der Regulation bestimmt werden. Dabei stabilisiert der LA Loop das Hexamer durch die Aufrechterhaltung der Loop Triade stabilisiert und hält die Protease somit im Ruhezustand.

Aufbauend hierauf, sollten weiterführende Mutantenanalysen der Loop Triade noch detaillierten Aufschluss über die Funktionsweise dieser quartären Proteinstruktur geben. Ebenfalls von großem Interesse sind die bereits angelaufenen Analysen der PDZ Domänen von DegP. Sie sollen Informationen über die Substratbindungen und die in dieser Arbeit bestimmte allosterische Aktivierung geben.

Die strukturellen, aber vor allem die neuen funktionellen Eigenschaften von DegP als allosterisch regulierte Protease können als Anstoß für Charakterisierungen weiterer Proteasen dienen. So haben laborinterne Analysen von Deletionsmutanten gezeigt, dass eine weitere periplasmatische Protease mit PDZ Domäne eine wichtige Rolle bei der Stressantwort von *E. coli* spielt (Braun, unveröffentlicht). Hierbei handelt es sich um die „Tail-specific Protease“ (Tsp), die nur dann ungefaltete Proteine verdaut, wenn sie zuvor eine 11 Aminosäure lange SsrA Signalsequenz an ihrer PDZ Domäne gebunden hat (Keiler *et al.*, 1996; Beebe *et al.*, 2000; Spiers *et al.*, 2002). Überlappend hierzu konnte für DegP ebenfalls eine Bindung dieser Signalsequenz und Proteolyse des Substrates gezeigt werden (Spiers *et al.*, 2002). Durch einen spezifischen Nachweis einer vergleichbaren allosterischen Aktivierung bei Tsp, wäre es möglich, die Theorie eines neuen allgemeinen Regulationsmechanismus im Periplasma für die Stressantwort aufzustellen.

Im weiteren soll durch die vollständige Funktionsanalyse von DegP und die Entwicklung von neuen Substraten und Inhibitoren die Möglichkeit für eine medizinische Anwendung z.B. als Antibiotika untersucht werden. Ein Problem bei den bisher entwickelten Inhibitoren für DegP ist, dass die abgeleiteten CMK und Boronsäurederivate als Medikament nicht verabreicht werden können. Ziel der Forschung muss es sein, dass aufgrund des hier entwickelten Enzymtests einen sogenannten High Throughput Screen (HTS) durchzuführen. Hierbei könnte DegP mit mehreren tausend Substanzen, z.B. abgeleitet von Naturstoffen, inkubiert werden und eine mögliche Inhibierung der Enzymaktivität bestimmt werden. Die dabei bestimmten Inhibitoren würden dann aufgrund der

gewonnenen Informationen der biochemischen und strukturellen Eigenschaften weiter spezifiziert werden, so dass sie nur noch DegP inhibieren und für die medikamentöse Behandlung genutzt werden könnten. Hierdurch wäre es möglich, ein neues, hochspezifisches Antibiotika herzustellen. Aufgrund dessen, dass DegP unter Stressbedingungen wie erhöhter Temperatur (Lipinska *et al.*, 1988) essentiell für das Überleben der Bakterienzelle ist, wäre die Wirksamkeit des Antibiotikums gewährleistet und die Möglichkeiten der spontanen Resistenzen minimiert.

Im weiteren sollen die gesammelten Informationen der Charakterisierung von DegP und die durch HTS Analysen gewonnenen Daten auch für die im eigenen Labor laufenden Untersuchungen im Bereich der Alzheimer- und Krebserkrankungen genutzt werden. Eine wichtige Funktion bei der Alzheimer Erkrankung spielt die humane HtrA Protease HtrA1, die die Aggregation der Amyloid- β Aggregate durch Proteolyse verhindert (Grau *et al.*, 2005). Da DegP im Vergleich zu HtrA1 in großen Mengen gereinigt werden kann und ein quantifizierbarer Enzymtest etabliert ist, sollen die gewonnenen Daten aus den Versuchsreihen mit DegP für die Analysen der humanen HtrA Mitglieder genutzt werden.

Ein erster Vorversuch mit einer kleineren Auswahl an Naturstoffen im HTS hat bereits einen vielversprechenden Kandidaten erbracht. Das Trifluoperazin zeigte in diesem HTS eine Inhibierung von DegP, die durch eigene Enzymtests nochmals bestätigt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine vollständige Inhibierung konnte nur bei einer Konzentration von 500 μ M erreicht werden. Wachstumskurven von *E. coli* in einem Medium mit einer Endkonzentration von 10 μ M Trifluoperazin führte zu einer vollständigen Wachstumshemmung. Dies zeigt, dass Trifluoperazin ein schwächerer Inhibitor für DegP ist, jedoch auch weitere essentielle Funktionen *in vivo* beeinflusst. Im weiteren wird diese Substanz bereits in noch geringen Mengen (0,5-10 mg pro 70kg Körpergewicht) bei der Behandlung von Schizophrenie benutzt (Marques *et al.*, 2004). Eine Optimierung und einhergehend damit eine Spezifikation dieses Inhibitors ist somit nötig.

7. Literatur

- Ades, S.E., Conolly, L.E., Alba, B.M. und Gross, C.A. (1999) The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor.
Genes Dev. **13**: 2449-2461
- Akiyama, Y., Kanehara, K. und Ito, K. (2004) RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences.
EMBO J. **23**: 4434-4442
- Alba, B.M., Zhong, H.J., Pelayo, J.C. und Gross, C.A. (2001) degS (hhoB) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity.
Mol. Microbiol. **40**:1323-1333
- Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z. und Gross, C.A. (2002) DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response.
Genes Dev. **16**: 2156-2168
- Alba, B.M. und Gross, C.A. (2004) Regulation of the *Escherichia coli* σ^E -dependent envelope stress response.
Mol. Microbiol. **52**: 613-619
- Asgeirsson, B. und Cekan, P. (2006) Microscopic rate-constants for substrate binding and acylation in cold-adaptation of trypsin I from Atlantic cod.
FEBS Letters **580**: 4639-4644
- Arockiasamy, A. und Krishnaswamy, S. (2000) Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein.
Anal. Biochem. **283**, 64-70
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Kunzler, P. und Thony-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **251**: 744-777

- Ay, J., Hilpert, K., Krauss, N., Schneider-Mergener, J. und Höhne, W. (2003) Structure of a hybrid squash inhibitor in complex with porcine pancreatic elastase at 1.8 Å resolution.
Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **59**: 247-254
- Backes, B.J., Harris, J.L., Leonetti, F., Craik, C.S. und Ellman, J.A. (2000) Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin.
Nat. Biotechnol. **18**: 187-193
- Baneyx, F. und Georgiou, G. (1991) Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates *in vivo*.
J. Bacteriol. **173**: 2696-2703
- Bannikov, G.A., Karelina, T.V., Collier, I.E., Marmer, B.L. und Goldberg, G.I. (2002) Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide.
J. Biol. Chem. **277**: 16022-16027
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. und Woessner, J.F. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes.
Elsevier, London, United Kingdom
- Baughman, D.J. (1970) Thrombin assay.
Methods Enzymol. **19**: 145-157
- Beebe, K.D., Shin, J., Peng, J., Chaudhury, C., Khera, J. und Pei, D. (2000) Substrate Recognition through a PDZ Domain in Tail-Specific Protease.
Biochemistry **39**: 3149 -3155
- Beidler, J.L., Hillard, P.R., und Rill, R.L. (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver.
Analyt. Biochem. **126**: 374-380
- Beil, A. (2003) Characterisation of DegP (HtrA) protease-chaperone machine
Dissertation, University of Cardiff
- Betton, J.M., Sassoon, N., Hofnung, M. und Laurent, M. (1998) Degradation versus aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **273**: 8897-8902

- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M. und Huber, R. (1997) Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 6070-6074
- Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. und Huber, R. (2000) The structures of HslU and the ATP dependent protease HslU-HslV.
Nature **403**: 800-805
- Bode W. (2007) Structure and interaction modes of thrombin.
Blood Cells Mol. Dis. **36**: 122-30
- Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M., Tortorella, D., Godlberg, A.L. und Ploegh, H. (1997) Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 6629-6634
- Boyd, D., Manoil, C. und Beckwith, J. (1987) Determinants of membrane protein topology.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 8525-8529
- Brock T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. und Parker, J. (2000) Biology of Microorganisms.
Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 9th edition, Chapter 3 and 13
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage λ and Mu.
J. Mol. Biol. **104**: 541-555
- Cezairliyan, B.O. und Sauer, R.T. (2007) Inhibition of regulated proteolysis by RseB.
Proc. Natl. Acad. Sci. **104**: 3771-3776
- Chaba, R., Grigorova, I.L., Flynn, J.M., Baker, T.A. und Gross, C.A. (2007) Design principles of the proteolytic cascade governing the σ^E -mediated envelope stress response in *Escherichia coli*: Keys to graded, buffered, and rapid signal transduction.
Genes & Dev. **21**: 124-136
- Chen, R. und Henning U. (1996) A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins.
Mol. Microbiol. **19**: 1287-1294
- Chung, C.T., Niemala, S.L. und Mitter, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli* : Transformation and storage of bacterial cells in the same solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 2172-2175

- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. und Barton, G.J. (2004) Jalview Java alignment editor.
Bioinformatics **20**: 426-427
- Clausen, T., Southan, C. und Ehrmann, M. (2002) The HtrA Family of Proteases: Implication for Protein Composition and Cell Fate.
Molecular Cell **10**: 443-455
- Collinet, B., Yuzawa, H., Chen, T., Herrera, C. und Missiakas, D. (2000) RseB binding to the periplasmic domain of RseA modulates the RseA:σ^E interaction in the cytoplasm and the availability of σ^E.RNA polymerase.
J. Biol. Chem. **275**: 33898-33904
- Cosma, C.L., Danese, P.N., Carlson, J.H., Silhavy, T.J. und Snyder, W.B. (1995) Mutational activation of the Cpx signal transduction pathway of *Escherichia coli* suppresses the toxicity conferred by certain envelope-associated stresses.
Mol. Microbiol. **18**: 491-505
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J. und Silhavy, T.J. (1995) The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP.
Genes & Dev. **9**: 387-398
- Danese, P.N. und Silhavy, T.J. (1998) Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*.
Annu. Rev. Genet. **32**: 59-94
- Danese, P.N., Oliver, G.R., Barr, K., Bowman, G.D., Rick, P.D. und Silhavy, T.J. (1998) Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates *degP* transcription in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **180**: 5875-5884
- Davril, M., Jung, M.L., Duportail, G., Lohez, M., Han, K.K. und Bieth, J.G. (1984) Arginine Modification in Elastase.
J. Biol. Chem. **259**: 3851-3857
- De Las Penas, A., Connolly, L., und Gross, C.A. (1997) The σ^E-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E.
Mol. Microbiol. **24**: 373-385
- Di Cera, E., Page, M.J., Bah, A., Bush-Pelc, L.A. und Garvey L.C. (2007) Thrombin allostery.
Phys. Chem. Chem. Phys. **9**: 1292-1306

- Duman, R.S., Nakagawa S. und Malberg, J. (2001) Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment.
Neuropsychopharmacology. **25**: 836-844
- Ehrmann, M. und Clausen, T. (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism.
Annu. Rev. Genet. **38**: 709-724
- Eigen, M. (1967) Kinetics of reaction control and information transfer in enzymes and nucleic acids.
Nobel Symp. **5**: 333-369
- Fanning, A.S. und Anderson, J.M. (1996) Protein-protein interactions: PDZ domain networks.
Curr. Biol. **6**: 1385-1388
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Sauer, R.T. und Baker, T.A. (2004) Modulating substrate choice: The SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation.
Genes & Dev. **18**: 2292-2301
- Fu, X., Parks, W.C. und Heinecke J.W. (2008) Activation and silencing of matrix metalloproteinases.
Semin. Cell Dev. Biol. **19**: 2-13
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S.A., Shridhar, V., Clausen, T. und Ehrmann, M. (2005) Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 6021-6026
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. und Huber, R. (2005) Molecular machines for protein degradation.
Chembiochem. **6**: 222-256
- Gross, C.A., Rhodius, V.A. und Grigorova, I.L. (2007) Regulation and function of the envelope stress response controlled by σ^E .
ASM Press, The Periplasm: 107-121
- Gottesman, S. (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **19**: 565-587
- Guigueno, A., Belin, P. und Boquet, P. (1997) Defective export in *Escherichia coli* caused by DsbA-PhoA hybrid proteins whose DsbA domain cannot fold into a conformation resistant to periplasmic proteases.
J. Bacteriol. **179**: 3260-3269

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**: 557-580
- Harrison, S.C. (1996) Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains.
Cell **86**: 341-343
- Harris, B.Z. und Lim, W.A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly.
J. Cell Sci. **114**: 3219-3231
- Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity.
Chem. Rev. **102**: 4501-4524
- Heimark, R.L. und Davie, E.W. (1981) Bovine and human plasma prekallikrein.
Methods Enzymol. **80**: 157-172
- Iwanczyk, J., Damjanovic, D., Kooistra, J., Leong, V., Jomaa, A., Ghirlando, R. und Ortega J. (2007) Role of the PDZ domains in *Escherichia coli* DegP protein.
J. Bacteriol. **189**: 3176-3186
- Jaspard, E. (2000) Role of protein-solvent interactions in refolding: effects of cosolvent additives on the renaturation of porcine pancreatic elastase at various pHs.
Arch. Biochem. Biophys. **375**: 220-228
- Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy, T.J. und Hultgren, S.J. (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems.
EMBO J. **21**: 6394-6406
- Jones, C.H., Dexter, P., Evans, A.K., Liu, C., Hultgren, S.J. und Hruby, D.E. (2002) *Escherichia coli* DegP protease cleaves between paired hydrophobic residues in a natural substrate: the PapA pilin.
J. Bacteriol. **184**: 5762-5771
- Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. und Rokita, S.E. (1985) The chemical modification of enzymatic specificity.
Ann. Rev. Biochem. **54**: 565-595
- Keiler, K.C., Waller, P.R. und Sauer, R.T. (1996) Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA.
Science **271**: 990-993

- Kim, K., Park, S., Kang, S., Cheong, G. und Chung, C. (1999) Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **294**: 1363-1374
- Kim, D.Y., Jin, K.S., Kwon, E., Ree, M. und Kim, K.K. (2007) Crystal structure of RseB and a model of its binding mode to RseA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 8779-8784
- Kobe, B. und Kemp, B.E. (1999) Active site-directed protein regulation.
Nature **402**: 373-376
- Koch, A.L. (1998) The biophysics of the Gram-negative periplasmic space.
Crit. Rev. Microbiol. **24**: 23-59
- Koebnik, R. (2000) *In vivo* membrane assembly of split variants of the *E.coli* outer membrane protein OmpA.
EMBO J. **15**: 3529-3537
- Kolmar, H., Waller, P.R. und Sauer, R.T. (1996) The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation.
J. Bacteriol. **178**: 5925-5929
- Koonin, E.V. und Aravind, L. (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection.
Cell Death Differ. **9**: 394-404
- Koshland, D.E., Nemethy, G. und Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits.
Biochemistry **5**: 365-385
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a protease-chaperone machine.
Nature **416**: 455-459
- Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP
Nature **453**: 885-890
- Krojer, T., Pangerl, K., Kurt, J., Sawa, J., Stingl, C., Mechtler, K., Huber, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2008-2) Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105**: 7702-7707

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685
- Lazar, S.W. und Kolter, R. (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins.
J. Bacteriol. **178**: 1770-1773
- Levchenko, I., Grant, R.A., Flynn, J.M., Sauer, R.T. und Baker, T.A. (2005) Versatile modes of peptide recognition by the AAA+ adaptor protein SspB.
Nat. Struct. Mol. Biol. **12**: 520-525
- Lipinska, B., Sharma, S., and Georgopoulos, C. (1988) Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription.
Nucleic Acids Res. **16**: 10053-10067
- Lipinska, B., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase.
J. Bacteriol. **172**: 1791-1797.
- Maniatis, T., Frisch, E.F., und Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Markland, F.S. und Smith, E.L.(1971) Subtilisin: primary structure, chemical and physical properties.
The Enzymes, 3rd Ed. (Boyer, P.D., ed.) **3**: 561-608
- Marques, L.O., Lima, M.S. und Soares, B.G. (2004) Trifluoperazine for schizophrenia.
Cochrane Database Syst Rev. **1**: CD003545
- Mileykovskaya, E. und Dowhan, W. (1997) The Cpx two component signal transduction pathway is activated in *Escherichia coli* mutant strains lacking phosphatidylethanolamine.
J. Bacteriol. **179**: 1029-1034
- Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics.
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Misra, R., Castillo Keller, M. und Deng, M. (2000) Overexpression of protease-deficient DegP(S210A) rescues the lethal phenotype of *Escherichia coli* OmpF assembly mutants in a *degP* background.
J. Bacteriol. **182**: 4882-4888

- Missiakas, D. und Raina, S. (1998) The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation.
Mol. Microbiol. **28**: 1059-1066
- Monod J., Wyman J. und Changeux J.P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model.
J. Mol. Biol. **12**: 88-118
- Nakayama, S. und Watanabe, H. (1995) Involvement of cpxA, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei* virF gene.
J. Bacteriol. **177**: 5062-5069
- Nemoda, Z. und Sahin-Toth, M. (2006) Chymotrypsin C (caldecrin) stimulates autoactivation of human cationic trypsinogen
J. Biol. Chem. **281**: 11879-11886
- Neurath, H., Walsh, K.A. und Winter, W.P. (1967) Evolution of structure and function of proteases.
Science **158**: 1638-1644
- Nikaido, H. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology.
ASM Press, 2 ed, vol. 1
- Nou, X. und Kadner R.J. (1998) Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of btuB expression in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **180**: 6719-6728
- Oliver, D.B. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology.
ASM Press, 2 ed, vol. 1
- Pallen, M. und Wren, B. (1997) The HtrA family of serine proteases.
Mol. Microbiol. **26**: 209-221
- Pampalakis, G. und Sotiropoulou, G. (2007) Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer.
Biochim. Biophys. Acta **1776**: 22-31
- Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin.
Nature **228**: 726-739
- Perutz, M.F. (1972) Nature of heme-heme interaction.
Nature **237**: 495-499

- Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M. und Dodson G.G. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited.
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **27**: 1-34
- Philipp, M. und Bender, M.L. (1983) Kinetics of subtilisin and thiolsubtilisin.
Mol. Cell Biochem. **51**: 5-32
- Pilcher, B.K., Gaither-Ganim, J., Parks, W.C. und Welgus, H.G. (1997) Cell type-specific inhibition of keratinocyte collagenase-1 expression by basic fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor. A common receptor pathway.
J. Biol. Chem. **272**: 18147-18154
- Pogliano, J.A., Lynch, S., Belin, D., Lin, E.C.C. und Beckwith, J. (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system.
Genes & Dev **11**: 1169-1182
- Radau, G. und Rauh, D. (2000) Synthesis of a Cyanopeptide-Analogue with Trypsin Activating Properties
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **10**: 779-781
- Raivio, T.L., Popkin, D.L. und Silhavy, T.J. (1999) The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition.
J. Bacteriol. **181**: 5263-5272
- Raivio, T.L. (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial Pathogenesis.
Mol. Microbiol. **56**: 1119-1128
- Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (1994) Families of serine peptidases.
Methods Enzymol. **244**: 19-61
- Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (2004) Introductions: serine peptidases and their clans.
Handbook of Proteolytic Enzymes vol. **2**: 1417-1439, Elsevier, London, United Kingdom
- Ricard, J. und Cornish-Bowden, A. (1987) Co-operative and allosteric enzymes: 20 years on.
Eur. J. Biochem. **166**: 255-272
- Rick, W. (1984) Chymotrypsin.
Methods Enzym. Anal., 3rd Ed. (Bergmeyer, H.U., ed.) **1**: 1045-1051
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R. und Silhavy, T.J. (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **183**: 6794-6800

- Robbins, K.C., Summaria, L. und Wohl, R.C. (1981) Human plasmin.
Methods Enzymol. **80**: 379-387
- Rosen, B.P. (1987) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology.
F. C. Neidhardt. Washington D. C., American Society for Microbiology: 760-767
- Rouvière, P.E. und Gross, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins.
Genes & Dev. **10**: 3170-3182
- Ruiz, N., Kahne, D. und Silhavy, T.J. (2002) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis.
Nat. Rev. Microbiol. **4**: 57-66
- Saras, J. und Heldin, C.H. (1996) PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins.
Trends Biochem. Sci. **21**: 455-458
- Schägger, H. und Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Anal. Biochem. **166**: 368-379
- Silhavy, T.J., Berman, M.L. und Enquist, L.W. (1984) Experiments with gene fusions.
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D. und Silhavy, T.J. (2007) Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*.
Genes & Dev. **21**: 2473-2484
- Skórko-Glonek, J., Wawrzynów, A., Krzewski, K., Kurpierz, K. und Lipinska, B. (1995) Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures.
Gene **163**: 47-52
- Skórko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A. Lipinska, B. (2006) Characterization of disulfide exchange between DsbA and HtrA proteins from *Escherichia coli*.
Acta Biochim. Pol. **53**: 585-589
- Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., DeLange, R.J., Landon, M. und Evans, W.H. (1966) The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg.
J. Biol. Chem. **241**: 5974-5976

- Snyder, W.B., Davis, L.J.B., Danese, P.N., Cosma, C.L. und Silhavy, T.J. (1995) Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway.
J. Bacteriol. **177**: 4216-4223
- Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997) Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase.
J. Biol. Chem. **272**: 6174-6178
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M. und Cantley, L.C. (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains.
Science **275**: 73-77
- Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S. und McKay, D.B. (2000) Crystal and solution structures of an HslUV protease-chaperone complex.
Cell **103**: 633-643
- Spiers, A., Lamb, H.K., Cocklin, S., Wheeler, K.A., Budworth, J., Dodds, A.L., Pallen, M.J., Maskell, D.J., Charles, I.G. und Hawkins, A.R. (2002) PDZ domains facilitate binding of high temperature requirement protease A (HtrA) and tail-specific protease (Tsp) to heterologous substrates through recognition of the small stable RNA A (ssrA)-encoded peptide.
J. Biol. Chem. **277**: 39443-39449
- Spiess, C. (1999) Amylase MalS und Protease DegP aus *Escherichia coli*: Faltung und Abbau unter Kontrolle der Temperatur.
Dissertation, Universität Konstanz
- Spiess, C., Beil, A. und Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein.
Cell **97**: 339-347
- Strauch, K.L. und Beckwith, J. (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 1576-1580
- Swamy, K.H., Chung, C.H. und Goldberg, A.L. (1983) Isolation and characterization of protease do from *Escherichia coli*, a large serine protease containing multiple subunits.
Arch. Biochem. Biophys. **224**: 543-554

- Uhland, K., Mondigler, M., Spiess, C., Prinz, W. und Ehrmann, M. (2000) Determinants of translocation and folding of TreF, a trehalase of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **275**: 23439-23445
- van Wielink, J.E. und Duine, J.A. (1990) How big is the periplasmic space?
Trends Biochem. Sci. **15**: 136-137
- Wang, J., Hartling, J.A. und Flanagan, J.M. (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis.
Cell **91**: 447-456
- Waller, P.R. und Sauer, R.T. (1996) Characterization of degQ and degS, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease.
J. Bacteriol. **178**: 1146-1153
- Walsh, K.A. (1970) Trypsinogens and trypsins of various species.
Methods Enzymol. **19**: 41-63
- Walsh, N.P., Alba, B.M., Bose, B., Gross, C.A. und Sauer, R.T. (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain.
Cell **113**: 1-2
- Wickner, S., Maurizi, M.R. und Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins.
Science **286**: 1888-1893
- Wilken, C., Kitzing, K., Kurzbauer, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2004) Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease.
Cell **117**: 483-493
- Wootton, J.C. und Drummond, M.H. (1989) The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins.
Protein Eng. **2**: 535-543
- Wright, C.S., Alden, R.A. und Kraut, J. (1969) Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution.
Nature **221**: 235-242
- Zabeau, M., und Roberts, R. (1979) The role of restriction endonucleases in molecular genetics.
Molecular Genetics Academic Press, ed. J.H. Taylor New York, Part **3**: 1-63

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Ehrmann für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchführen zu können. Er ermöglichte mir mit diesem Thema das selbständige Arbeiten und stand mir gleichzeitig bei Fragen helfend zur Seite. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Kollegen/innen.

Im weiteren möchte ich unseren Kooperationspartnern im Chemical-Genomic-Centre am Max-Planck-Institut in Dortmund für die Synthese der benötigten Peptide danken. Hier insbesondere Patrick Hauske und Dr. Markus Kaiser.

Für die Synthese des ersten pNA Substrates und die Maldi-TOF Untersuchungen danke ich Dr. Tobias Krojer und Dr. Tim Clausen vom Institut für Molekulare Pathologie (IMP) in Wien.

Ebenso ein Dank an Frau Dr. Luitgard Nagel-Steger für die Möglichkeit Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation im Institut für Physikalische Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchzuführen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Michael Meltzer
geboren am 14.12.1978
in Eschwege / Hessen
ledig

Ausbildungsweg

2005-2008	Anfertigung der Promotion an der Universität Duisburg-Essen im Institut für Mikrobiologie II <i>Titel der Doktorarbeit:</i> Struktur- und Funktionsanalyse der hochkonservierten Stressprotease DegP von <i>E. coli</i>
1999-2005	Studium der Biologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf mit abschließender Diplomarbeit im Institut für Molekularbiologie der Prokaryoten <i>Titel der Diplomarbeit:</i> Analyse der Bindung bakterieller Transkriptionsfaktoren, einzeln und in Kombination an die regulatorische Region ausgewählter rRNA Operons
1998 – 1999	Ableistung des Zivildienstes
1995 – 1998	Albert-Schweitzer Gymnasium Plettenberg
1989 – 1995	Städtische Realschule Kaldenkirchen
1985 – 1989	Katholische Grundschule Breyell

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Struktur- und Funktionsanalyse der hochkonservierten Stressprotease DegP von *E. coli*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Michael Meltzer befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Ehrmann
2. Gutachter: Prof. Siebers
3. Gutachter: Prof. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008